



HAL
open science

Caractérisation biochimique et fonctionnelle du code tubuline des plaquettes sanguines

Quentin Kimmerlin

► **To cite this version:**

Quentin Kimmerlin. Caractérisation biochimique et fonctionnelle du code tubuline des plaquettes sanguines. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg, 2022. Français. NNT : 2022STRAJ036 . tel-04008834

HAL Id: tel-04008834

<https://theses.hal.science/tel-04008834>

Submitted on 28 Feb 2023

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

INSERM UMR_S1255 Biologie et pharmacologie des plaquettes sanguines : hémostasie, thrombose, transfusion

THÈSE

Présentée par

Quentin KIMMERLIN

Soutenue le 16 Septembre 2022

Pour obtenir le grade de : Docteur de l'université de Strasbourg
Discipline/S spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Caractérisation biochimique et fonctionnelle du code tubuline des plaquettes sanguines

THÈSE DIRIGÉE PAR :

M François LANZA

DR1, INSERM, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme Marie-Jo MOUTIN

DR, CNRS, Université de Grenoble

M Bernard PAYRASTRE

PU-PH, Université Purpan-Toulouse

EXAMINATEUR :

Mme Anne-Cécile REYMANN

CR, CNRS, Université de Strasbourg

UMR_S1255, EFS Grand Est, Université de Strasbourg :

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

Directeur : Pierre Mangin

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

Directeur de thèse :

M François LANZA

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

Ce travail fut soutenu par l'Université de Strasbourg via un contrat doctoral, par la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) via une subvention de fin de thèse (FDT202106013085), par l'Établissement Français du Sang (EFS) ainsi que par l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).



Remerciements :

J'ai toujours cru que la partie la plus simple à rédiger dans une thèse était les remerciements, et c'est d'ailleurs la raison pour laquelle celle-ci est restée blanche jusqu'au dernier moment. J'étais fou, mais complètement fou ! En réalité, les phrases les plus difficiles à écrire sont là.

Pour trouver l'inspiration et tenter de vaincre le démon de la page blanche qui me hante en ce mardi après-midi plus que banal, je me suis installé dans la petite salle derrière la cafétéria. Pourtant, et ce malgré mes efforts, je ne peux pas m'empêcher d'être ailleurs. Je me retrouve perdu dans les limbes du passé, à ressasser des souvenirs que je croyais à jamais perdus, à revivre mes premiers pas universitaires et mes premiers cours, mes tout premiers résultats expérimentaux, mes premières frustrations mais aussi et surtout mes premières réussites scientifiques. Je sens comme une douce vague de chaleur qui m'emplit, une étreinte nostalgique qui enlace mon esprit timide et qui ne veut pas me laisser partir. Il est toutefois temps de me libérer, car c'est presque fini ! Ecrire cette dernière partie signifie pour moi la fin d'une aventure inoubliable. Il me faut maintenant penser à l'avenir, et surmonter l'appréhension d'un futur encore incertain, futur qui je l'espère, sera heureux. A toi Quentin du futur, si l'envie te reprends un jour de relire ta thèse, j'espère que tu profites de ta vie. Dans le cas contraire, puisses-tu trouver réconfort et motivation dans ces quelques mots du passé.

Pour trouver l'inspiration et tenter de vaincre le démon de la page blanche qui me hante en ce mardi après-midi plus que banal, je me suis installé dans la petite salle derrière la cafétéria. Et pourquoi ne pas simplement retranscrire à l'écrit les pensées qui traversent mon esprit ?! Je dois dire que je suis fier, très fier de mon parcours oui, mais aussi et surtout très fier de tous les chemins croisés et de toutes les rencontres que j'ai eu la chance de faire. Parce qu'il est une chose dont je suis profondément certain, seul, jamais je n'aurais été là, un mardi après-midi banal dans la salle derrière la cafétéria, à écrire ces quelques lignes. Et c'est pour cette raison que je tiens à remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu interagir, de près ou de loin : cette partie vous est dédiée. Je ne suis pas des plus habiles pour m'exprimer, alors je tâcherai de rester bref. Pardonnez ma simplicité, mais les phrases et les mots les plus simples sont parfois les plus sincères.

Je tiens ainsi tout d'abord à remercier très chaleureusement Christian Gachet ainsi que Pierre Mangin, ancien et actuel directeur de l'unité, respectivement, pour m'avoir permis d'intégrer leur laboratoire et d'y faire mes années de master et de doctorat. Merci pour votre soutien indéfectible, particulièrement dans cette dernière année de thèse. Merci encore à toi Pierre pour tes conseils pour notre histoire double KO, pour ton regard critique toujours bienveillant, et aussi pour avoir relu ce manuscrit.

Merci à l'université de Strasbourg ainsi qu'à la Fondation pour la Recherche Médicale et ses donateurs pour m'avoir permis de réaliser et terminer cette thèse.

Je souhaite ensuite remercier Mme. Anne-Cécile Reymann, Mme. Marie-Jo Moutin ainsi que M. Bernard Payrastre pour m'accorder un peu de leur temps afin d'évaluer mon travail de thèse. Puissiez-vous trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à François Lanza. Merci pour m'avoir pris sous ton aile tout au long de ces années, pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir donné l'opportunité de grandir scientifiquement. Je suis très heureux et fier d'avoir pu travailler à tes côtés. Tu as toujours été là pour moi, et saches que j'éprouve et je continuerai d'éprouver à jamais un profond respect et une immense reconnaissance à ton égard, tant sur le plan scientifique qu'humain. Grazie di cuore.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent également à Sylvie Moog, qui m'accompagne depuis mon arrivée au laboratoire et sans qui je n'aurais jamais, et j'insiste bien sur « jamais », pu réaliser tout ce travail. Merci d'avoir pris le temps de m'apprendre à manipuler et de m'avoir transmis tes techniques, Dieu sait que ça n'était pas gagné ! Merci pour nos longs débats scientifiques, essentiels dans la maturation de nos projets, qu'ils eussent été sur les niveaux de détyrosination en l'absence de tubuline $\alpha 4A$ ou sur les granules plaquettaires. Merci enfin pour ta bonne humeur, tu as toujours su trouver le mot pour rire, pour me reconforter ou me remotiver, que ça soit au laboratoire ou au bar après quelques bières. Je te dois énormément, et cette thèse t'es dédiée tout particulièrement. Je pourrais encore écrire davantage de lignes, mais je vais m'arrêter là au risque de te faire peur ! 58 millions de mercis.

Merci aussi à Catherine Strassel, qui m'accompagne également depuis mon arrivée au laboratoire et chez qui la porte est toujours ouverte. Merci pour tout, même pour les extractions d'ADNs de banane avec les petits enfants ! ;) Merci encore à toi pour avoir relu mon ce manuscrit.

Je veux remercier mes collègues étudiants, anciens et nouveaux, Florian, Sasha, Axelle, Kim, Valentin, Anaïs, Adèle, Inès, Julie, Emily, Cyril, Mathieu, Rémy, Gabriel, Kévin, Usman ! Merci pour avoir rendu ces années très agréables.

Je souhaite aussi remercier tous les membres du laboratoire pour leur aide et pour l'ensemble des échanges que nous avons pu avoir. Merci à Valérie, Catherine B, Yannick, Catherine L, Clarisse, Alicia, Amandine, Nathalie, Stephanie, Béatrice, Catherine R, Desline, Cécile, Marc, Josiane, Alexandra, Yotis, Maxime, Catherine A, Nico, Sébastien, Gabrielle, Luc et Blandine, l'équipe microscopie électronique avec Anita, Jean-Yves, David et Fabienne ainsi que le laboratoire d'hémostase avec Arnaud, Véro, Pat et Julien. Merci à vous tous ! Je remercie sincèrement l'équipe de l'animalerie, avec Monique, Ketty, Catherine Z, Lauriane et Nolwenn, qui s'occupent de nos petites souris et sans qui une très grande majorité de mes projets n'auraient pas pu voir le jour. Merci beaucoup !

Evidemment, je ne pouvais pas oublier d'envoyer un grand Merci à M. Pascal Fritz, dont la bonne humeur quotidienne était pour moi une bouffée d'air frais indispensable pour bien commencer la journée ! Highlander te salue !

Je souhaite remercier Carsten Janke et Magda Magiera pour leur accueil à Orsay, et pour toutes les discussions que nous avons pu avoir. Vous avez énormément contribué à mon travail, Merci !

Je terminerai enfin par mes frères de cœur, Ibrahim, Lucas, Raoul et Erwan, ma compagne Léa ainsi que ma famille, mes parents et ma sœur pour leur soutien. Pas besoin d'un long discours pour vous exprimer ma reconnaissance, cette thèse vous est également dédiée.

Je m'excuse pour tous ceux que j'ai pu oublier. Je n'en suis pas moins reconnaissant : MERCI !

Table des matières :

Liste des abréviations :	i
Liste des figures :	v
Liste des tableaux :	vii
Liste des annexes :	vii

AVANT-PROPOS

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE..... 1

Première partie : Les plaquettes sanguines :..... 3

A. La formation des plaquettes sanguines :..... 5

1. Les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques :..... 5

a. Les cellules souches hématopoïétiques :..... 5

b. Les progéniteurs hématopoïétiques :..... 6

c. Les voies biaisées vers la mégacaryopoïèse :..... 7

2. Les précurseurs mégacaryocytaires :..... 8

a. La polyploïdisation :

b. Développement du système de membrane interne :..... 11

c. Formation des granules plaquettaires :

d. La classification des précurseurs mégacaryocytaires :..... 13

3. Les mégacaryocytes matures :

a. Historique et hypothèses :..... 14

b. Zoom sur les proplaquettes :..... 15

c. Le processus de thrombopoïèse :..... 16

4. Régulation de la production plaquettaire :..... 18

a. Les facteurs extrinsèques :..... 18

b. Les facteurs intrinsèques :..... 20

c. La clairance des plaquettes :..... 22

B. Les fonctions des plaquettes sanguines :..... 23

1. Les plaquettes circulantes, ultrastructure et caractéristiques :

a. La membrane plasmique :..... 24

b. Le cytosquelette :..... 25

c. Les granules plaquettaires :..... 26

d. Les mitochondries et réserves de glycogène :..... 26

2. Les plaquettes activées, rôle dans l'hémostase :..... 27

a. L'hémostase primaire :..... 28

b.	L'hémostase secondaire :.....	31
c.	Modèles d'hémostase, de thrombose et analyse des fonctions plaquettaires :.....	33
3.	Rôles secondaires, non-hémostatiques, des plaquettes :	35
a.	Immunité innée :	36
b.	Cancer et dissémination métastatique :.....	36
Deuxième partie : Le cytosquelette de microtubule :		39
A. Le microtubule, structure et dynamique :.....		40
1.	L'hétérodimère de tubuline α et β :	40
a.	Découverte de l'hétérodimère de tubuline α et β :	40
b.	Les monomères de tubuline α et β :.....	41
c.	La structure des hétérodimères de tubuline α et β :	42
2.	La formation des hétérodimères de tubuline α et β :.....	42
a.	La voie de biosynthèse des tubulines α et β :.....	42
b.	L'autorégulation de la tubuline :	44
3.	La polymérisation des hétérodimères en microtubules :.....	45
a.	Les centres organisateurs des microtubules et la tubuline γ :.....	45
b.	La dynamique de polymérisation des microtubules, une histoire d'instabilité :.....	46
c.	Régulation de la dynamique des microtubules :.....	47
B. Le code tubuline, régulateur des fonctions des microtubules :		48
1.	Les isotypes de tubuline :	48
a.	Particularités des isotypes :	48
b.	Importance des isotypes de tubuline dans les fonctions cellulaires :.....	49
2.	Les modifications post-traductionnelles de la tubuline :	50
a.	L'acétylation de la tubuline :	51
b.	La détyrosination de la tubuline :	53
c.	Les tubulines $\Delta 2$ et $\Delta 3$:.....	55
d.	Les polymodifications de la tubuline, focus sur glutamylation et glycylation :.....	55
e.	Modifications post-traductionnelles peu étudiées :.....	59
3.	Les MAPs, modulation par le code tubuline :	59
C. Microtubules et code tubuline dans la lignée mégacaryocytaire :		61
1.	L'organisation et les fonctions des microtubules :	61
a.	Dans les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques :.....	61
b.	Dans les mégacaryocytes :.....	62
c.	Dans les plaquettes au repos :	63
d.	Dans les plaquettes activées :	65
2.	Le code tubuline dans la lignée plaquettaire :	66
a.	Les isotypes de tubuline dans la lignée plaquettaire :	67

b. Modifications post-traductionnelles de tubuline dans la lignée plaquettaire :.....	68
c. Les protéines associées aux microtubules dans la lignée plaquettaire :	71
3. Les tubulinopathies plaquettares :	72
OBJECTIFS DE THÈSE.....	74
RESULTATS EXPERIMENTAUX	76
Projet 1 : L'isotype de tubuline α 4A.....	77
Projet 2 : L'isotype de tubuline α 8.....	132
Projet 3 : Les modifications post-traductionnelles de la tubuline	145
DISCUSSION GÉNÉRALE	178
Premier axe : les isotypes de tubuline.....	179
Deuxième axe : les modifications post-traductionnelles	188
CONCLUSION.....	194
ANNEXES (articles)	197
Annexe 1 : An essential role for α 4A-tubulin in platelet biogenesis	198
Annexe 2 : The tubulin code in platelet biogenesis	221
Annexe 3 : Isolation of mouse megakaryocyte progenitors	233
RÉFÉRENCES	248

Liste des abréviations :

AAA - ATPases Associated with diverse cellular Activities	CD - Cluster of Differentiation
ACD - Acid-Citrate-Dextrose	CHO - Chinese Hamster Ovary
ADAM - A Disintegrin And Metalloproteinase	CIP4 - Cdc42 Interacting Protein 4
ADN - Acide DésoxyriboNucléique	CLASP - Cytoplasmic Linker ASSociated Protein
ADP - Adenosine DiPhosphate	CLIP-170 - Cytoplasmic LInker Protein 170
Akt - PKB, Protein Kinase B	CLP - Common Lymphoid Progenitor
ANOVA - ANalysis Of VAriance	CMP - Common Myeloid Progenitor
APC - Adenomatous Polyposis Coli	CO₂ - Dioxyde de Carbone
ARN - Acide RiboNucléique	CP - Cultured Platelets
αTAT1 - αTubulin N-AcetylTransferase	CRP - Collagen-Related Peptide
ATP - Adenosine TriPhosphate	DCX - DoubleCortin X
AU - Arbitraty Unit	Detyr - Detyrosinated
BAK - BCL2 Antagonist/Killer 1	DIOC6 - 3,3'-Dihexyloxacarboyanine iodide
Bcl-XL - B-Cell Lymphoma-extra large	DKO - Double KnockOut (α4A- and β1-tubulin)
BLOC - Biogenesis of Lysosome-related Organelles Complex	DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium
BSA - Bovine Serum Albumin	DMS - Demarcation Membrane System
Ca²⁺ - Ion calcium	DMSO - DiMethyl SulfOxide
CAP - Cytoskeleton-Associated Protein	DP - Donor Platelets
CCD - Charge Coupled Device	DTT - DiThioThreitol
CCDC66 - Coiled-Coil Domain Containing 66	EB3 - End Binding Protein 3
CCP - Cytosolic CarboxyPeptidase	ECT2 - Epithelial Cell Transforming 2
CCT - Chaperonin Containing TCP-1	EDTA - EthyleneDiamineTetraacetic Acid

EFS - Établissement Français du Sang

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ELP3 - Elongator Acetyltransferase Complex Subunit 3

F-BAR - Fes/CIP4 homology-Bin/Amphiphysin/Rvs

FBS - Fetal Bovine Serum

FeCl₃ - Ferric Chloride

FIB-SEM - Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy

FSC - Forward Scatter

GATA1 - GATA Binding Protein 1

GCN5 - General Control Non-depressible 5

GCP - gTubulin Complex Protein

GDP - Guanosine DiPhosphate

GEF-H1 - rho Guanine nucleotide Exchange Factor H1

GFP - Green Fluorescent Protein

GLUT - GLUcose Transporter

GP - GlycoProtein

GTP - Guanosine TriPhosphate

HCl - Chlorhydric Acid

HDAC6 - Histone DeAcetylase 6

HSD (Tukey) - Honest Significance Test

HeLa - HENrietta LACKs

HEPES - 4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid

HRP - HorseRadish Peroxidase

HSC - Hematopoietic Stem Cell

IL - InterLeukine

JAK - JAnus Kinase

kDa - KiloDALton

KIF - KInesin Superfamily

KLF1 - Kruppel Like Factor 1

KO - KnockOut

KOA4A - α 4A-tubulin knockout

KOB1 - β 1-tubulin knockout

Lin - LIneage

LMPP - Lymphomyeloid-Primed Progenitor

LTA - Light Transmission Aggregation

MACF1 - Microtubule Actin Crosslinking Factor 1

MAP - Microtubule Associated Protein

MATCAP - Microtubule Associated Tyrosine CarboxyPeptidase

MCAK - Mitotic Centromere-Associated Kinesin

mDia1 - Mammalian DIaphanous-related formin 1

MEP - Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor	San - Separation ANxiety
MFI - Mean Fluorescence Intensity	Sca-1 - Stem Cell Antigen-1
MKp - MegaKaryocyte progenitor	SCF - Stem Cell Factor
MPP - MultiPotent Progenitor	SDS-PAGE - Sodium Dodecyl-Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
MTOC - MicroTubule Organizing Center	SEM - Scanning Electron Microscopy
NaCl - Sodium Chloride	shRNA - Small Hairpin RNA
NF-E2 - Nuclear Factor, Erythroid 2	SIRT2 - SIRTuin 2
OPD - O-Phenylenediamine Dihydrochloride	SSC - Side SCatter
PACSN2 - Protein Kinase C And Casein Kinase Substrate In Neurons 2	STAT - Signal Transducer and Activator of Transcription
PAR - Protease Activated Receptor	SVBP - Small Vasohibin Binding Protein
PBS - Phosphate-Buffered Saline	TCP - Tubulin CarboxyPeptidase
PDMS - PolyDiMethylSiloxane	TEM - Transmission Electron Microscopy
PFD - PreFolDin	TFC - Tubulin Folding Cofactor
PGI2 - ProstaGlandin I2	TLR4 - Toll-Like Receptor 4
PI3K - PhosphoInositide 3-Kinases	TMEM16F - TransMEMbrane protein 16F
PRP - Platelet-Rich Plasma	TNFa - Tumor necrosis factor a
PSG - Penicillin-Streptomycin-Glutamine	TP - prostanoid TP receptor (thromboxane receptor)
PTM - Post-Translational Modification	TPO - Thrombopoïétine
qRT-PCR - quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	TTC5 - Tetratricopeptide Repeat Domain 5
RANBP10 - RAN Binding Protein 10	TTL - Tubulin-Tyrosine Ligase
RhoA - Ras HOMolog family member A	TLL - Tubulin-Tyrosine Ligase-Like
RUNX1 - RUNX family transcription factor 1	TxA2 - Thromboxane A2

Tyr - Tyrosinated

VASH - VASoHibin

VWF - Von Willebrand Factor

WT - Wild Type

XMAP215 - Xenopus Microtubule Associated Protein 215

γTURC - γ Tubulin Ring Complexes

Liste des figures :

Figure 1 : Premiers dessins de plaquettes par Giulio Bizzozero.....	4
Figure 2 : Les plaquettes sanguines	4
Figure 3 : L'hématopoïèse classique.....	5
Figure 4 : Polyploïdisation des mégacaryocytes	10
Figure 5 : Territoires cytoplasmiques du DMS	11
Figure 6 : Développement du DMS au cours de la maturation des mégacaryocytes	11
Figure 7 : Biogenèse des granules plaquettaires.....	12
Figure 8 : Les différents stades de maturation des précurseurs mégacaryocytaires	13
Figure 9 : Les deux théories du mécanisme de thrombopoïèse	14
Figure 10 : Proplaquettes de culture et proplaquettes formées dans la moelle	16
Figure 11 : De la proplaquette à la plaquette, un remodelage dans la microcirculation	17
Figure 12 : La boucle de régulation de la masse plaquettaire par la thrombopoïétine	19
Figure 13 : La régulation de la mégacaryopoïèse.....	20
Figure 14 : L'ultrastructure des plaquettes.....	23
Figure 15 : Les principaux récepteurs d'adhérence et d'activation des plaquettes.....	24
Figure 16 : L'hémostase	27
Figure 17 : L'hémostase primaire.....	28
Figure 18 : La signalisation plaquettaire.....	29
Figure 19 : L'hémostase secondaire, cascade de coagulation	31
Figure 20 : Étudier l'hémostase, la thrombose et les fonctions plaquettaires	33
Figure 21 : Les rôles du cytosquelette de microtubule	39
Figure 22 : La structure du microtubule.....	40
Figure 23 : Les trois grands domaines fonctionnels des tubulines α et β	42
Figure 24 : La biosynthèse des tubulines α et β	43
Figure 25 : L'auto-régulation de la tubuline	44
Figure 26 : Le centrosome.....	45

Figure 27 : La nucléation des microtubules par la tubuline γ	45
Figure 28 : L'instabilité dynamique des microtubules	46
Figure 29 : Les isotypes de tubuline, forte homologie protéique.....	48
Figure 30 : Premiers indices des modifications post-traductionnelles de la tubuline	50
Figure 31 : Les principales modifications post-traductionnelles des tubulines α et β	51
Figure 32 : L'acétylation de la lysine K40 des tubulines α	52
Figure 33 : Le cycle de détyrosination de la tubuline α	53
Figure 34 : Les tubulines α n'encodent pas toutes génétiquement une tyrosine C-terminale	53
Figure 35 : Les sites de (poly)glutamylation de la queue C-terminale des tubulines α et β	56
Figure 36 : Les protéines associées aux microtubules (MAPs)	60
Figure 37 : L'organisation des microtubules dans les mégacaryocytes	62
Figure 38 : Les microtubules des plaquettes sanguines.....	63
Figure 39 : La bande marginale	64
Figure 40 : La réorganisation de la bande marginale lors de l'activation plaquettaire	65
Figure 41 : Perte de la forme discoïde pour une morphologie ovoïde en l'absence de tubuline $\beta 1$.	67
Figure 42 : Impacts potentiels de la géométrie plaquettaire sur leurs capacités hémostatiques ..	184
Figure 43 : Phénotype plaquettaire de souris totalement inactivées pour la protéine SVBP (KOSVBP) ou inactivées spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire pour l'enzyme TTL (KO _{meg} TTL)...	190

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Les granules plaquettaires	26
Tableau 2 : Les familles de tubuline α et β	41
Tableau 3 : Les enzymes impliquées dans la (poly)glutamylolation des tubulines α et β	56
Tableau 4 : Les enzymes impliquées dans la (poly)glycylation des tubulines α et β	58
Tableau 5 : Principales MAPs ayant un rôle identifié dans la lignée plaquettaire.....	71
Tableau 6 : Mutations de tubulines associées à des défauts plaquettaires chez l'Homme	73

Liste des annexes :

Annexe 1 : Article : An essential role for α 4A-tubulin in platelet biogenesis.....	198
Annexe 2 : Article : The tubulin code in platelet biogenesis	221
Annexe 3 : Article : Isolation of mouse megakaryocyte progenitors	233

AVANT-PROPOS

AVANT-PROPOS

AVANT-PROPOS

Les plaquettes sanguines sont des fragments cellulaires anucléés et discoïdes qui assurent l'hémostase, c'est-à-dire l'arrêt des saignements. Elles sont produites par les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse à l'issue de deux processus physiologiques successifs, à savoir la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse. La mégacaryopoïèse permet de générer les précurseurs cellulaires des plaquettes, les mégacaryocytes, qui se caractérisent par une très grande taille et leur noyau polyploïde. La thrombopoïèse permet quant à elle aux mégacaryocytes de produire des plaquettes par l'intermédiaire de protrusions cytoplasmiques très spécialisées, les proplaquettes, qui pénètrent les vaisseaux sinusoides de la moelle afin d'y libérer les futures plaquettes. Pour être menées à bien, la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse nécessitent de profonds remaniements cellulaires, assurés en partie par le cytosquelette de microtubules. Les microtubules sont particulièrement importants dans i) la polyploïdisation des mégacaryocytes ; ii) la formation des proplaquettes et ; iii) le maintien de la forme discoïde circulante des plaquettes, en établissant un anneau de microtubules sous-membranaire unique chez les mammifères appelé bande marginale.

Les microtubules sont l'un des trois constituants du cytosquelette avec les microfilaments d'actine et les filaments intermédiaires. Ils sont impliqués dans un large panel de fonctions, comme la division et le transport intracellulaire, et sont constitués d'un enchaînement d'hétérodimères de tubulines α et β . L'incroyable polyvalence fonctionnelle des microtubules repose sur l'expression différentielle d'une grande palette d'isotypes de tubuline décorés de nombreuses modifications post-traductionnelles (glutamylatation, détyrosination...). La diversité ainsi générée permet d'établir un code tubuline qui, *in fine*, permet le recrutement d'effecteurs spécialisés dédiés à la mise en place ou au maintien de leurs diverses fonctions. Le code tubuline permet ainsi aux cellules, comme les mégacaryocytes et leurs plaquettes, de finement réguler le comportement d'une population ou d'une sous-population de microtubules dans l'espace et le temps.

Le projet de thèse consiste à élucider, sous l'angle du code tubuline, le rôle des microtubules dans la biologie des plaquettes. Il implique la caractérisation biochimique et fonctionnelle de plusieurs isotypes de tubuline propres à cette lignée cellulaire, ainsi que de leurs modifications post-traductionnelles. Dans ce manuscrit, nous débuterons par une introduction générale structurée en deux parties, l'une étant dédiée aux plaquettes, à leur biogenèse et à leurs fonctions dans l'hémostase et au-

AVANT-PROPOS

dela, et l'autre étant dédiée au cytosquelette de microtubule et au code tubuline. Nous présenterons ensuite les objectifs de cette thèse et les deux grands axes sur lesquels j'ai travaillé, centrés sur les rôles respectifs i) des isotypes $\alpha4A$ et $\alpha8$ et ii) des différentes modifications post-traductionnelles de la tubuline dans la biologie plaquettaire. Les résultats de chacun des projets seront présentés sous la forme de manuscrits, au nombre de trois (2 pour le premier projet, et 1 pour le deuxième). Dans une dernière partie, nous discuterons enfin des résultats, avant de terminer par une conclusion générale.

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE

Première partie

Les plaquettes sanguines

Les plaquettes sanguines :

Dans le règne eucaryote, les organismes unicellulaires sont alimentés en oxygène par diffusion passive depuis l'extérieur (Monahan-Earley et al., 2013). Bien que très peu coûteux en énergie, ce type de transfert reste toutefois limité par la surface d'échange disponible avec le milieu ambiant. Il n'est ainsi pas compatible avec la multicellularité, où la diffusion passive devient vite insuffisante au regard des dimensions des organismes complexes comme les vertébrés. Pour assurer la bonne distribution des gaz et nutriments, les vertébrés tirent profit d'un système vasculaire fermé où s'écoule un tissu indispensable à la vie, le sang. Il se compose d'une fraction aqueuse très riche en protéines appelée plasma, dans laquelle circulent trois types cellulaires spécialisés : i) les érythrocytes ou globules rouges qui transportent l'oxygène ; ii) les leucocytes ou globules blancs qui assurent l'immunité et ; iii) les thrombocytes ou plaquettes, qui nous intéressent ici et qui permettent l'hémostase, c'est-à-dire l'arrêt et la prévention des saignements (van der Meijden and Heemskerk, 2019). Pour la grande majorité des espèces de vertébrés, comme les oiseaux ou encore les reptiles, les thrombocytes sont des cellules nucléées (Svoboda and Bartunek, 2015). Les mammifères font toutefois figure d'exception car leurs équivalents, appelés plaquettes, sont à l'inverse complètement dépourvus de noyau. Ils sont également les plus petits éléments cellulaires sanguins chez ces espèces, avec un diamètre de 2 à 5 μm .

Premières observations. Les premières observations de plaquettes remontent à la fin du XVII^{ème} siècle suite au développement des premiers microscopes optiques. Les plaquettes ne furent toutefois caractérisées qu'à partir du XIX^{ème} siècle (Brewer, 2006). En particulier, c'est en 1865 que fut publiée l'une des toutes premières descriptions morphologiques et précises des plaquettes par le biologiste allemand Max Schultze (Schultze, 1865). Lui n'était pas hématologue et utilisait plutôt le sang humain comme matériel facilement accessible pour étudier l'influence de la température sur le protoplasme (contenu cellulaire). Il remarqua toutefois dans ses échantillons la présence de nombreux agrégats composés de petites sphérules transparentes, d'apparence granulaire et d'un diamètre de l'ordre du micromètre (Brewer, 2006; Gazzaniga and Ottini, 2001). Il faudra encore attendre une vingtaine d'années avant que l'hématologue italien Giulio Bizzozero réussisse à établir un portrait

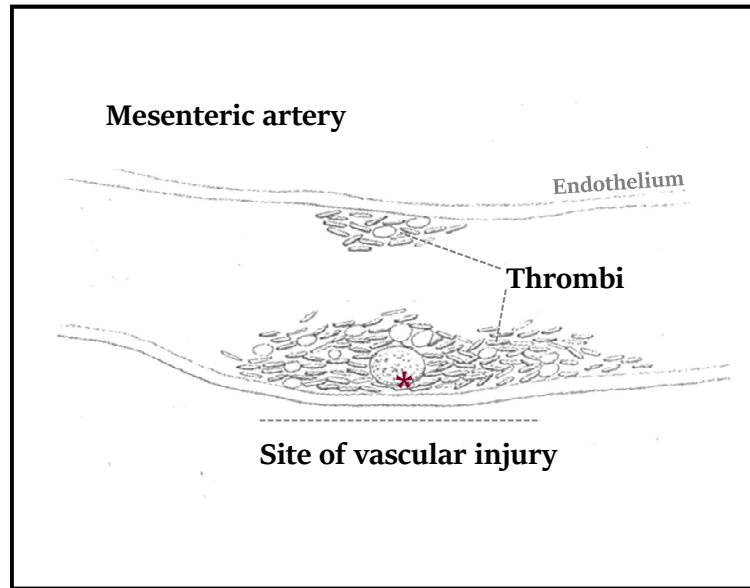
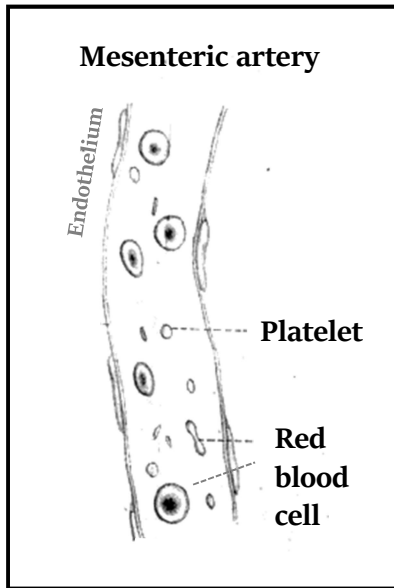


Figure 1 : Premiers dessins de plaquettes par Giulio Bizzozero. (Gauche) L'observation fut réalisée dans une artère mésentérique chez le Cochon d'Inde, dans laquelle le flux sanguin fut préalablement arrêté. Il distingue des plaquettes circulantes discoïdes et des globules rouges. (Droite) Lorsqu'une lésion vasculaire est réalisée, ici par pression mécanique avec une aiguille contre les parois de l'artère, il observa que les plaquettes adhéraient au site endothélial lésé et s'agrégeaient pour former un thrombus. Il nota par ailleurs la présence d'un globule blanc dans le thrombus, indiqué par le symbole * rouge. Adapté de Brewer, 2006.

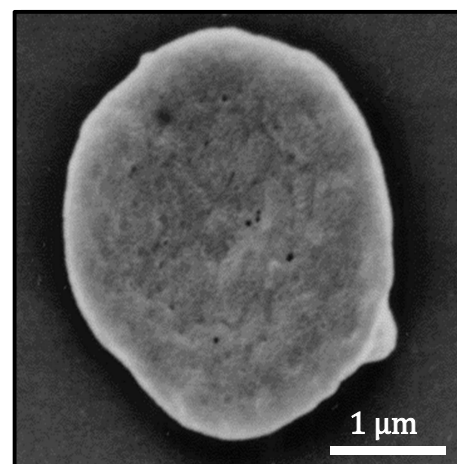
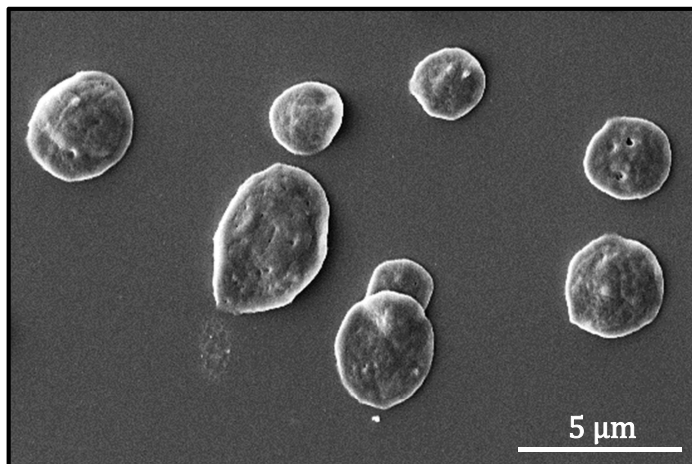


Figure 2 : La plaquette sanguine. La plaquette est un fragment cellulaire anucléé de forme lenticulaire et d'un diamètre de 2 à 5 μm . (Gauche) Image représentative par microscopie électronique à balayage de plusieurs plaquettes humaines, posées à plat et observées en vue équatoriale. (Droite) Image représentative par microscopie électronique à balayage d'une plaquette humaine observée en vue équatoriale, à fort grossissement. Les cavités, visualisées sous forme de points noirs recouvrant la surface plaquettaire, indiquent la présence de système canaliculaire ouvert, qui sera abordé plus tard. Images réalisées par Sylvie Moog et Anita Eckly (EFS Grand-Est, UMR_S1255).

plus détaillé des minuscules éléments de Schultze, qu'il parvint à observer directement dans les vaisseaux sanguins (Bizzozero, 1882). Il rapporta qu'ils étaient anucléés, de forme lenticulaire à l'état circulant et que, suite à une lésion vasculaire, ils pouvaient agréger ensemble pour former un thrombus (**Figure 1**). Les observations poussèrent Bizzozero à proposer, très justement, que ces sphérules devaient être impliquées dans l'arrêt des saignements. Il les rebaptisa alors du nom de *Piastrine* en Italien, signifiant « petites plaques » en référence à leur forme plate et lenticulaire caractéristique (**Figure 2**). Le terme fut ensuite traduit par *Plaquette* en Français, puis *Platelet* en Anglais, avant d'être définitivement adopté par la communauté scientifique.

Débats historiques. Pendant longtemps, l'origine cellulaire des plaquettes est restée inconnue. En réalité, beaucoup pensaient qu'elles dérivait de l'un des deux types cellulaires sanguins déjà identifiés à l'époque, à savoir les érythrocytes ou les leucocytes. L'hématologue français Georges Hayem affirmait par exemple qu'elles provenaient des globules rouges, car il semblait discerner dans leur cytoplasme un reflet rougeâtre suggérant la présence d'hémoglobine. Max Schultze, par opposition, leur attribuait une origine leucocytaire en raison de leur aspect granulaire, habituellement retrouvé dans les globules blancs (Gazzaniga and Ottini, 2001). De son côté, Bizzozero était convaincu que les plaquettes étaient en réalité un troisième type cellulaire indépendant. Il avait notamment l'intuition qu'elles provenaient de la moelle osseuse, à l'image des érythrocytes sur lesquels il avait déjà travaillé (Mazzarello et al., 2001). Il faudra toutefois attendre 1906, soit quelques années seulement après la mort de Bizzozero, pour que cette hypothèse soit finalement confirmée. Le pathologiste américain James Wright présenta ainsi le mégacaryocyte, une cellule géante de la moelle, comme le précurseur des plaquettes (Wright, 1906) qu'il libère dans la circulation selon des mécanismes encore imparfaitement caractérisés aujourd'hui (Boscher et al., 2020). Dans cette partie, nous nous intéresserons aux grandes étapes de formation des mégacaryocytes et des plaquettes, ainsi qu'à leurs fonctions dans l'hémostase et au-delà.

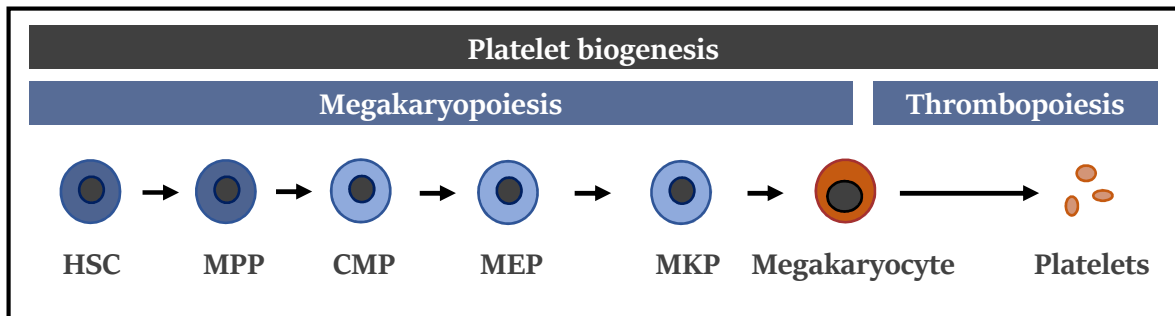
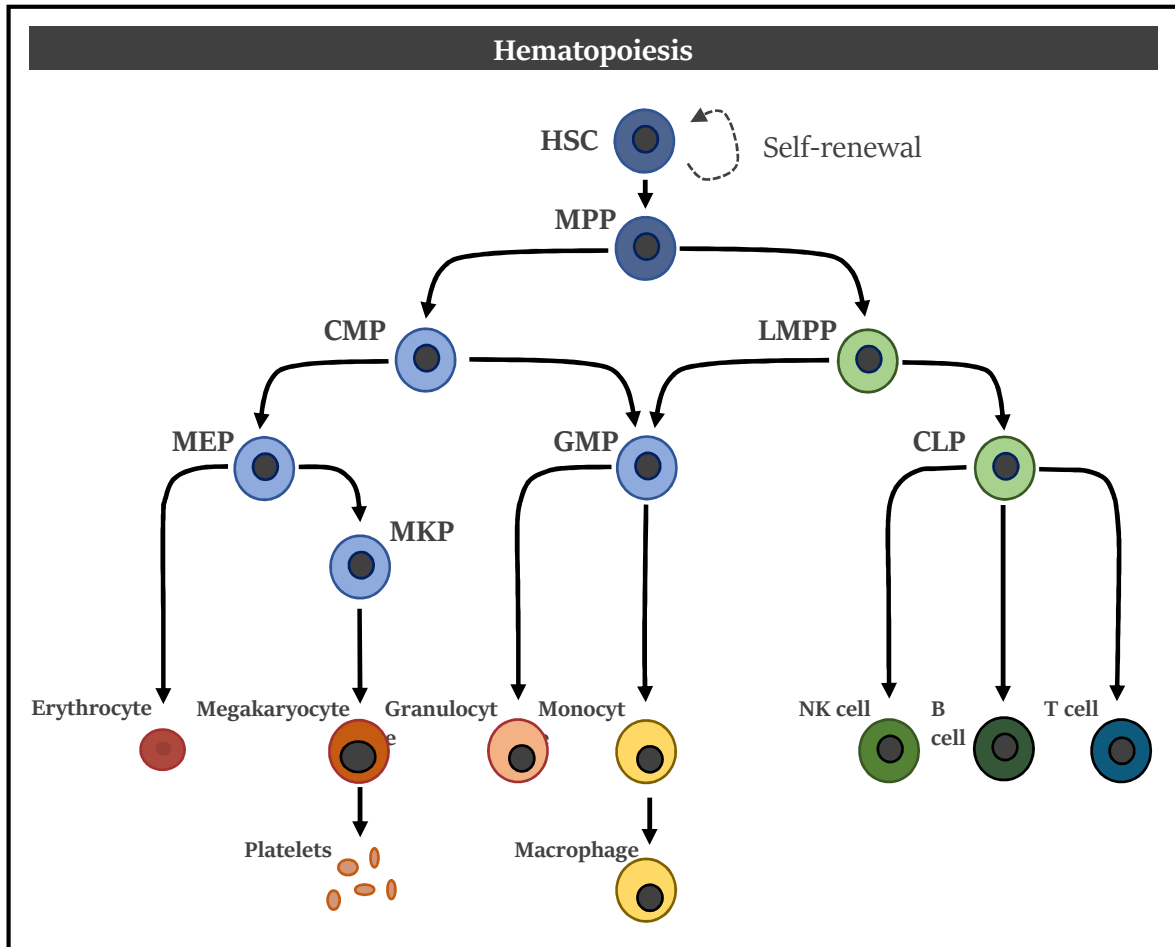


Figure 3 : L'hématopoïèse classique. (Haut) L'hématopoïèse assure la formation de tous les types cellulaires sanguins. Elle débute par la cellule souche hématopoïétique, qui s'engage et se différencie progressivement en précurseurs puis progéniteurs avant de donner naissance au type cellulaire mature. (Bas) Pour ce qui est de la biogenèse des plaquettes, elle est assurée par un processus classiquement subdivisé en deux étapes : D'abord la mégacaryopoïèse qui permet de générer des mégacaryocytes, puis enfin la thrombopoïèse qui permet quant à elle au mégacaryocyte de libérer des plaquettes dans la circulation sanguine. Adapté de Maclean et al, 2016. Abréviations: HSC, Hematopoietic Stem Cell; MPP, MultiPotent Progenitor; CMP, Common Myeloid Progenitor; LMPP, Lymphoid-primer MultiPotent Progenitor; MEP, Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor; GMP, Granulocyte-Macrophage Progenitor; CLP, Common Lymphoid Progenitor; MKP, Megakaryocyte Precursor.

A. La formation des plaquettes sanguines :

La production de l'ensemble des cellules sanguines et de leurs précurseurs est assurée par une population de cellules souches multipotentes localisées dans la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques, au cours d'un processus physiologique complexe appelé hématopoïèse (**Figure 3**). La formation des plaquettes est classiquement subdivisée en deux étapes avec i) la mégacaryopoïèse qui permet, à partir d'une cellule souche hématopoïétique, de générer des mégacaryocytes ; et ii) la thrombopoïèse, qui permet aux mégacaryocytes de libérer des milliers de plaquettes dans la circulation. Les deux processus permettent ainsi de générer jusqu'à 2.10^{11} plaquettes par jour chez l'Homme (10^9 chez la souris) (Vainchenker et al., 2013). De cette manière, ils compensent la courte durée de vie des plaquettes (8 à 10 jours chez l'Homme, et 4 à 5 jours chez la souris), tout en maintenant une numération sanguine stable d'environ 150 à 450.10^9 plaquettes/L chez l'Homme (800 à 1200.10^9 /L pour la souris). Dans cette partie, nous aborderons les grandes étapes de la formation des plaquettes, en partant du sommet de la hiérarchie avec la cellule souche hématopoïétique jusqu'aux plaquettes circulantes.

1. Les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques :

a. Les cellules souches hématopoïétiques :

Le concept de cellules souche. Il prend ses origines dans les expériences pionnières des canadiens James Till et Ernest McCulloch, publiées au cours de l'année 1961. Ils étudiaient l'effet des radiations sur l'animal, dans un contexte de Guerre Froide où la peur nucléaire était omniprésente et où les conséquences de la radioactivité sur la santé étaient encore mal connues. L'équipe canadienne avait remarqué, lors de greffes de moelle osseuse chez la souris, que les cellules greffées assuraient l'hématopoïèse et colonisaient curieusement la rate où elles donnaient naissance à plusieurs types cellulaires comme les granulocytes ou les mégacaryocytes (Till and McCulloch, 1961). Pour expliquer leurs observations, Till et McCulloch postulèrent l'existence des cellules souche hématopoïétiques capables de générer différents lignages cellulaires. Leur découverte suscita un engouement majeur, particulièrement dans le domaine de la médecine régénérative, et motiva de nombreuses équipes à davantage s'intéresser à cette population cellulaire.

Ontogénie et caractéristiques. Les cellules souches hématopoïétiques apparaissent lors de l'embryogenèse dans une zone mésodermique intra-embryonnaire appelée aorte-gonade-mésonephros. Elles colonisent ensuite rapidement le foie foetal d'où elle garantiront l'hématopoïèse embryonnaire (Medvinsky and Dzierzak, 1996). Peu avant la naissance, les cellules souches hématopoïétiques migreront vers la moelle osseuse (des os courts et plats), lieu final de l'hématopoïèse post-embryonnaire chez l'adulte. Dans la moelle, la population de cellules souches hématopoïétiques est très rare (<0.01% des cellules nucléées chez la souris) et se localise dans les niches péri-vasculaires où elle reste en majorité quiescente (Abkowitz et al., 2002; Crane et al., 2017; Trumpp et al., 2010). Elle se définit selon deux critères essentiels, avec : i) la multipotence, permettant la génération des lignées myéloïdes et lymphoïdes et ; ii) l'auto-renouveaulement par division asymétrique, un processus stochastique qui permet à la fois de générer une nouvelle cellule souche, mais aussi une nouvelle cellule progénitrice qui s'engagera quant à elle dans l'hématopoïèse (Loeffler and Schroeder, 2021; Seita and Weissman, 2010). Depuis l'identification de la première population enrichie de cellules souches hématopoïétiques au début des années 1990 (Spangrude, 1991), leur phénotype moléculaire fut progressivement raffiné. Elle se caractérise aujourd'hui par l'expression combinatoire de plusieurs marqueurs protéiques de surface, à savoir $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{C-kit}^+ \text{CD48}^- \text{CD150}^+$ pour la souris (Kiel et al., 2005) et $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^- \text{CD90}^+ \text{CD45RA}^- \text{CD49f}^+$ (Notta et al., 2011) pour l'Homme. Il est à noter que ces populations sont encore très hétérogènes, et ne sont pas encore pures en cellules souches.

b. Les progéniteurs hématopoïétiques :

Dans le modèle classique (Figure 3), les cellules souches hématopoïétiques de la moelle qui s'engagent dans l'hématopoïèse passent d'abord par une série de stades intermédiaires, appelés progéniteurs hématopoïétiques, avant d'atteindre le type cellulaire mature. Les progéniteurs hématopoïétiques se caractérisent par i) leur incapacité à s'auto-renouveler et ; ii) leur potentiel de différenciation, qui se restreint progressivement au cours de leur engagement dans l'hématopoïèse. Ils perdent donc les deux caractéristiques distinctives des cellules souches, mais gagnent en contrepartie un fort pouvoir prolifératif. Dans la hiérarchie, les premiers progéniteurs après les cellules souches sont les progéniteurs multipotents (MPP), toujours dotés de multipotence mais dénués d'auto-renouveaulement (Seita and Weissman, 2010). Nous préciserons ici que ces progéniteurs multipotents peuvent

d'ores-et-déjà montrer une préférence pour la formation de certains lignages hématopoïétiques. La sous-population MPP2 est par exemple la seule à produire des plaquettes suite à leur greffe chez la souris (Pietras et al., 2015). Les sous-populations MPP3 et MPP4 reconstituent préférentiellement la lignée des granulocytes-macrophages et la lignée lymphocytaire, respectivement, alors que la sous-population MPP1 ne montre aucune préférence. L'entrée des cellules dans la mégacaryopoïèse peut donc être marquée dès le stade du progéniteur MPP, dont le potentiel de différenciation commence alors par se restreindre progressivement. Le MPP s'engage ainsi dans la voie du progéniteur myéloïde commun (CMP), perdant tout potentiel lymphocytaire (Akashi et al., 2000). Le CMP bifurque ensuite vers le stade de progéniteur bipotent mégacaryocyte-érythrocyte (MEP) (Pronk et al., 2007), qui donnera enfin naissance au précurseur mégacaryocytaire immature (MKp) (Nakorn et al., 2003) puis aux mégacaryocytes. Tout comme pour les cellules souches, des populations enrichies en progéniteurs hématopoïétiques furent identifiées à l'aide de différents marqueurs protéiques de surface, à l'image des populations de MEP ($\text{Lin}^- \text{Sca-1}^c \text{-Kit}^+ \text{CD16/32}^- \text{CD150}^+ \text{CD9}^{\text{dim}}$) et de MKp ($\text{Lin}^- \text{Sca-1}^c \text{-Kit}^+ \text{CD16/32}^- \text{CD150}^+ \text{CD9}^{\text{bright}}$) de souris rapportées en **Annexe 3**. Les populations furent par ailleurs caractérisées sur le plan fonctionnel, notamment *in vitro* par des tests clonogéniques. Nous noterons qu'une population de progéniteurs hématopoïétique résidant en dehors de la moelle, dans le poumon, fut également récemment identifiée (Lefrançais et al., 2017). Les auteurs proposent, sur la base de transplantations pulmonaires, que le poumon constituerait un réservoir de progéniteurs inactifs, qui ne sortiraient de l'organe que pour repeupler la moelle en cas de forte demande (déficience médullaire par exemple). Leur hypothèse reste toutefois controversée car l'induction d'un état pro-inflammatoire suite à la chirurgie de transplantation pourrait exacerber la sortie ou l'activité des progéniteurs, ne reflétant ainsi pas la réalité à l'équilibre homéostatique (Jahandideh et al., 2020).

c. Les voies biaisées vers la mégacaryopoïèse :

La vision très linéaire et hiérarchisée de l'hématopoïèse présentée jusque-là est aujourd'hui rediscutée, notamment depuis la découverte des cellules souches hématopoïétiques biaisées vers la mégacaryopoïèse qui contournent les différents stades de progéniteurs intermédiaires (Haas et al., 2015; Nishikii et al., 2015; Yamamoto et al., 2013). En réalité, les cellules souches hématopoïétiques peuvent partager de nombreuses caractéristiques avec celles de la lignée mégacaryocytaire, tant sur un

plan transcriptionnel (Haas et al, 2015) que protéique (Sanjuan-Pla et al., 2013). Elles peuvent ainsi exprimer des protéines habituellement associées aux mégacaryocytes telles que l'intégrine α IIb, des facteurs de transcription comme RUNX1 ou encore le Facteur Willebrand (Huang and Cantor, 2009; Sanjuan-Pla et al., 2013). De manière intéressante, une partie de ces cellules souches hématopoïétiques reconstitue la lignée plaquettaire indépendamment des stades de progéniteurs intermédiaires (Rodriguez-Fraticelli et al, 2018). Les mécanismes contrôlant cette différenciation restent toutefois encore obscurs. Il fut néanmoins rapporté que les cellules souches hématopoïétiques pouvaient directement générer, par divisions asymétriques, des progéniteurs mégacaryocytaires (Yamamoto et al., 2013). La division cellulaire pourrait ainsi constituer une piste d'exploration pour élucider l'origine d'un tel biais plaquettaire. En plus des cellules souches, une population de progéniteurs hématopoïétiques unipotents biaisés vers la mégacaryopoïèse fut également identifiée (Haas et al., 2015). Elle est directement issue des cellules souches, et donne naissance à des mégacaryocytes en s'affranchissant, là-encore, des stades de progéniteurs intermédiaires. Elle n'est cependant active qu'en cas de besoin aigu, comme en conditions de stress inflammatoire qui peuvent entraîner une forte consommation de plaquettes. Les progéniteurs hématopoïétiques biaisés vers la mégacaryopoïèse incarneraient ainsi une voie secondaire du processus, plus directe et par conséquent, plus adaptée à des situations d'urgence où un manque de plaquette pourrait vite s'avérer fatal. Il faudra toutefois nuancer l'ensemble de ces résultats, car ils n'ont pour l'instant été observés et étudiés que chez la souris. Leur présence et importance fonctionnelle chez l'Homme reste encore incertaine (Notta et al., 2016).

2. Les précurseurs mégacaryocytaires :

Pour donner un mégacaryocyte, les précurseurs mégacaryocytaires (aussi appelés mégacaryocytes immatures) s'engagent dans un processus de maturation. Ils acquièrent trois caractéristiques essentielles qui leurs permettent de générer des plaquettes fonctionnelles. En particulier, ils i) deviennent polyploïdes par endomitose; ii) développent un système de membranes internes, qui sert de réservoir membranaire aux futures plaquettes ; et iii) élaborent des granules spécialisés, qui sont indispensables aux bonnes fonctions plaquettaires (Machlus et al., 2014). Le processus de maturation des mégacaryocytes s'accompagne de l'apparition de plusieurs récepteurs caractéristiques à la lignée qui, au de-là de leurs fonctions que nous détaillerons plus tard, constituent d'excellents marqueurs de

différentiation et de maturation. Nous retrouvons ainsi l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (CD41-CD61), récepteur d'adhérence du fibrinogène ; le complexe glycoprotéique GPIb-V-IX (CD42), récepteur d'adhérence du Facteur Willebrand ou encore ; la glycoprotéine VI, récepteur d'activation plaquettaire liant le collagène. Au terme de leur maturation, les mégacaryocytes peuvent atteindre une très grande taille allant jusqu'à 60 μm de diamètre (Levine et al., 1982). Ils représentent environ 0.1% des cellules nucléées de la moelle et assurent chacun la production d'environ 3000 plaquettes. Dans cette partie, nous aborderons les trois grandes étapes de maturation des précurseurs mégacaryocytaires.

a. La polyploïdisation :

Définition. La polyploïdisation des précurseurs mégacaryocytaires se fait par des cycles successifs d'endomitose, un processus unique à la lignée plaquettaire chez les mammifères adultes. L'endomitose est semblable à une mitose classique, à une exception : la séparation physique de la cellule mère en deux cellules filles, appelée cytokinèse, est bloquée. Le matériel génétique s'accumule par conséquent dans la cellule, et le mégacaryocyte devient alors polyploïde.

Initier le cycle d'endomitose. Le processus d'endomitose permet aux mégacaryocytes d'atteindre une ploïdie de 8 à 64N (Jackson et al., 1997). Il reste mal caractérisé au niveau biochimique, mais ferait appel à des protéines du cycle cellulaire. Il reposerait notamment sur les cyclines E, qui sont normalement impliquées dans l'entrée des cellules en phase S (Chu et al., 2021). Bien que l'absence totale de cycline E chez la souris entraîne la mort du nouveau-né après la naissance, il est quand même possible d'évaluer l'impact de l'inactivation sur les cellules hématopoïétiques du foie fœtal. Les mégacaryocytes montrent ainsi après 3 jours en culture, une forte réduction du niveau de ploïdie, qui passe alors de 32N en moyenne chez le contrôle à seulement 8N pour les cellules inactivées (Geng et al., 2003). Par opposition, la surexpression de cycline E dans une lignée de souris entraîne une nette hyperploïdie des mégacaryocytes de la moelle, qui ne se répercute toutefois pas sur le chiffre plaquettaire (Eliades et al., 2010). Il est à noter que la surexpression de cycline D3, qui est également impliquée dans l'entrée des cellules dans la phase S, entraîne également une hyperploïdisation des mégacaryocytes de la moelle chez la souris (Zimmet et al., 1997). L'une des hypothèses serait alors que les cyclines D3 et E promeuvent ensemble l'entrée systématique des mégacaryocytes en phase

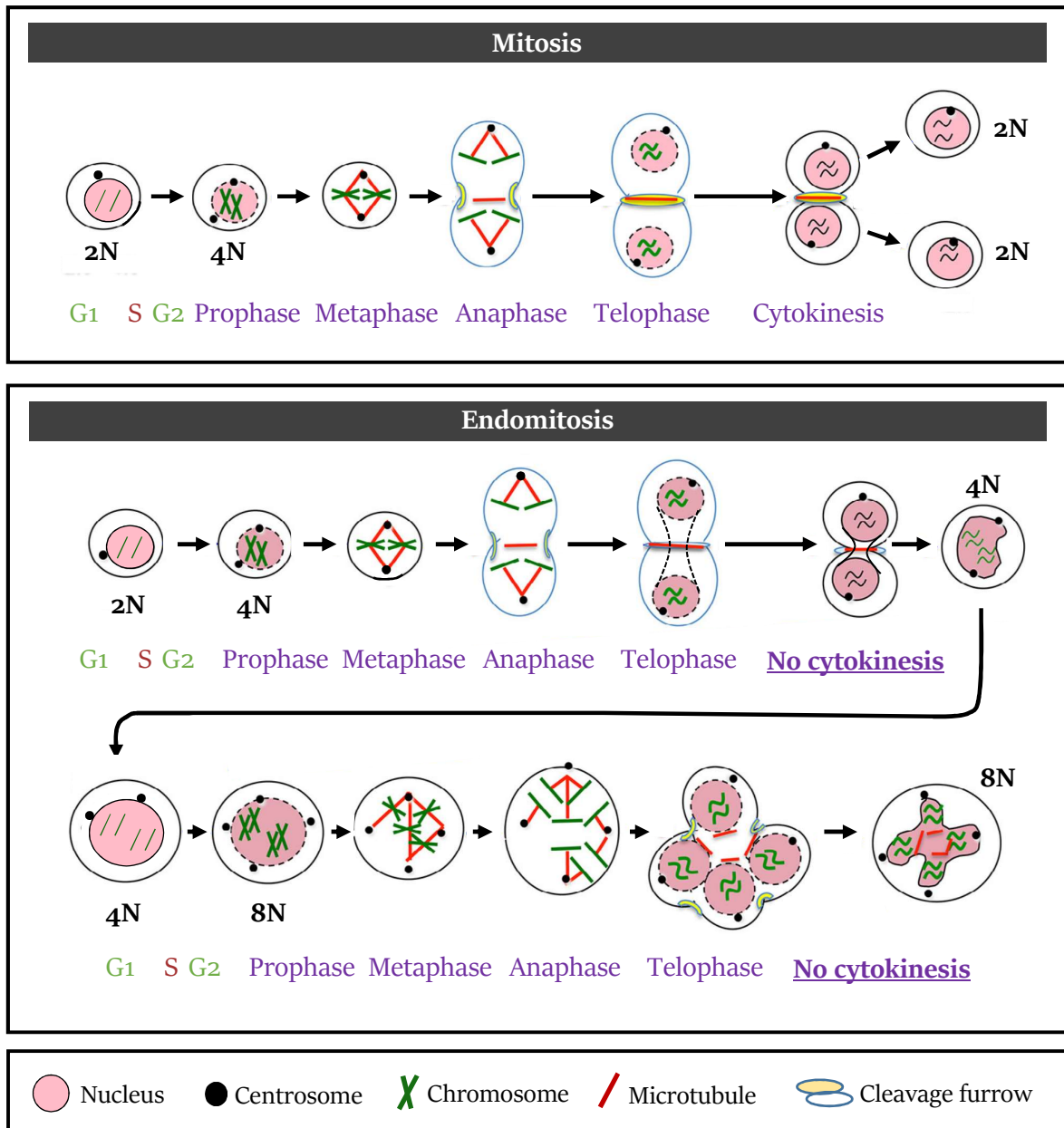


Figure 4 : Polypléidisation des mégacaryocytes. (Haut) Dans le cas de la mitose, les étapes de prophase, de métaphase, d'anaphase, de télophase et de cytokinèse se déroulent, conduisant à la formation de deux cellules filles contenant chacune un set de chromosomes. (Bas) Dans le cas de l'endomitose, le précurseur mégacaryocytaire commence le cycle et passe les étapes de prophase, de métaphase, d'anaphase et de télophase, mais pas de cytokinèse. Il est à noter que la karyokinèse, c'est-à-dire le processus qui permet de reformer deux nouveaux noyaux autour des sets de chromosomes des futures cellules filles lors de la cytokinèse, n'est pas complet. Par conséquent, le mégacaryocyte devient polypléide, atteignant une pléidie de 8 à 64N et présentant un seul noyau polylobé. Adapté de Mazzi et al, 2018.

S, obligeant les cellules à compléter plusieurs cycles d'endomitose et leur permettant d'atteindre un niveau de ploïdie élevé.

Terminer le cycle d'endomitose. Pour achever un cycle d'endomitose, les mégacaryocytes doivent empêcher l'étape de cytokinèse. En temps normal, la cytokinèse est assurée par un anneau contractile d'actomyosine, dont la formation et l'activité MYH10-dépendante sont contrôlées par la protéine à activité GTPase RhoA. Elle permet à l'anneau de serrer progressivement la cellule mère en son centre, de manière à former deux lobes contenant chacun un set de chromosome qui donneront chacun une cellule fille (**Figure 4**). Dans les mégacaryocytes, la formation et l'activité de cet anneau contractile sont bloquées par deux mécanismes concomitants, à savoir i) par l'inactivation de RhoA, réalisée indirectement en réprimant l'expression de ses facteurs activateurs Ect2 et GEF-H1 (Gao et al., 2012) ; et ii) par la répression transcriptionnelle du gène de la myosine MYH10 par le facteur de transcription RUNX1 (Lordier et al., 2012a). Les deux mécanismes sont nécessaires au bon déroulement du processus de polyploïdisation, si bien qu'inactiver RhoA ou réprimer l'expression de MYH10 par shRNA conduit à une hyperploïdie des mégacaryocytes (Lordier et al., 2012a; Pleines et al., 2012). Telle que, l'absence d'anneau contractile conduirait à la formation de cellules polynucléées : or les mégacaryocytes n'ont qu'un seul noyau. En plus d'une cytokinèse avortée, les mégacaryocytes ne subissent ainsi pas non plus le processus de karyokinèse (Lordier et al., 2012b) qui permet, en temps normal, de dégrader la membrane nucléaire de la cellule mère afin d'en reformer deux nouvelles dans les futures cellules filles. L'absence combinée de cytokinèse et de karyokinèse garantit ainsi aux mégacaryocytes l'intégrité du cytoplasme et de leur noyau, conduisant par conséquent à des cellules polyploïdes contenant un seul et unique noyau d'aspect polylobé. Il est à noter que la polyploïdie ne semble cependant pas strictement nécessaire à la formation des plaquettes car les mégacaryocytes embryonnaires, qui sont majoritairement diploïdes, restent malgré tout capables de faire des plaquettes (Potts et al., 2014). Bien que ceci n'ait pas été formellement démontré, la polyploïdie pourrait toutefois offrir un meilleur rendement plaquettaire (Mattia et al., 2002). Elle pourrait notamment permettre une synthèse massive de protéines (Raslova et al., 2003), garantissant le bon développement du réseau de membrane interne et des granules.

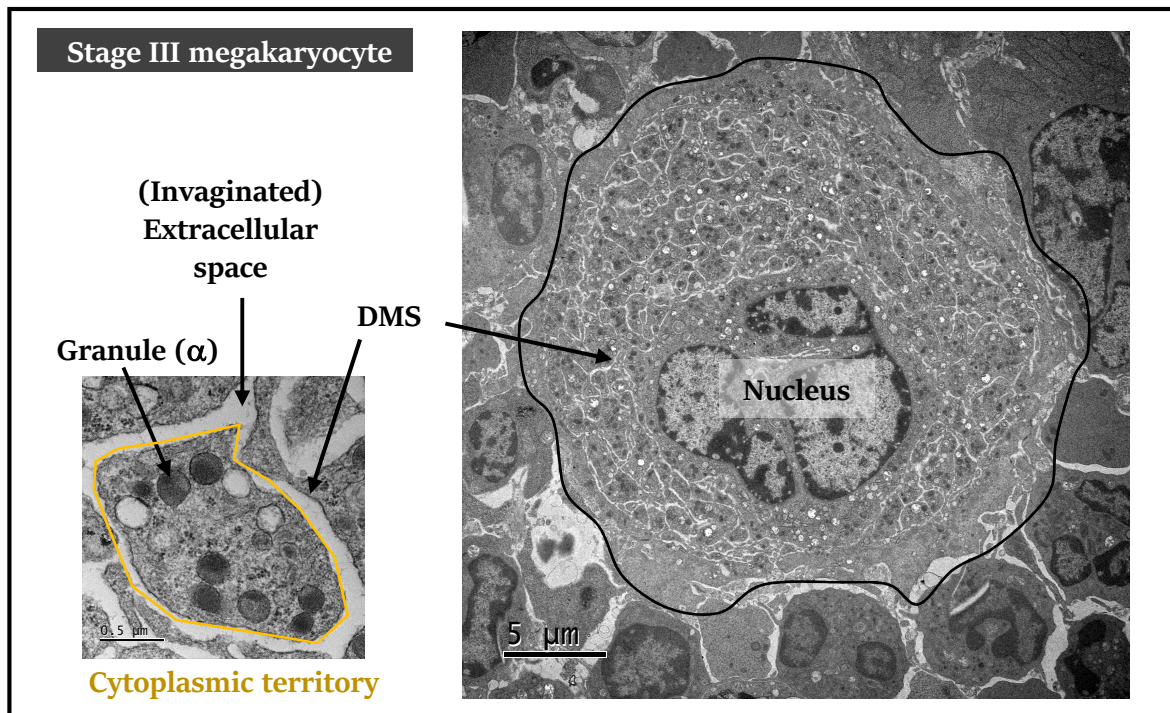


Figure 5 : Territoires cytoplasmiques du DMS. Image représentative par microscopie électronique à transmission d'un mégacaryocyte mature (délimité à droite par le liseré noir) observé sur une coupe de moelle de souris. L'encart du coin inférieur gauche illustre un territoire cytoplasmique (délimité par le liseré jaune), évoquant des plaquettes préformées contenant des granules plaquettaires. Image par Anita Eckly (EFS Grand-Est, UMR_S1255).

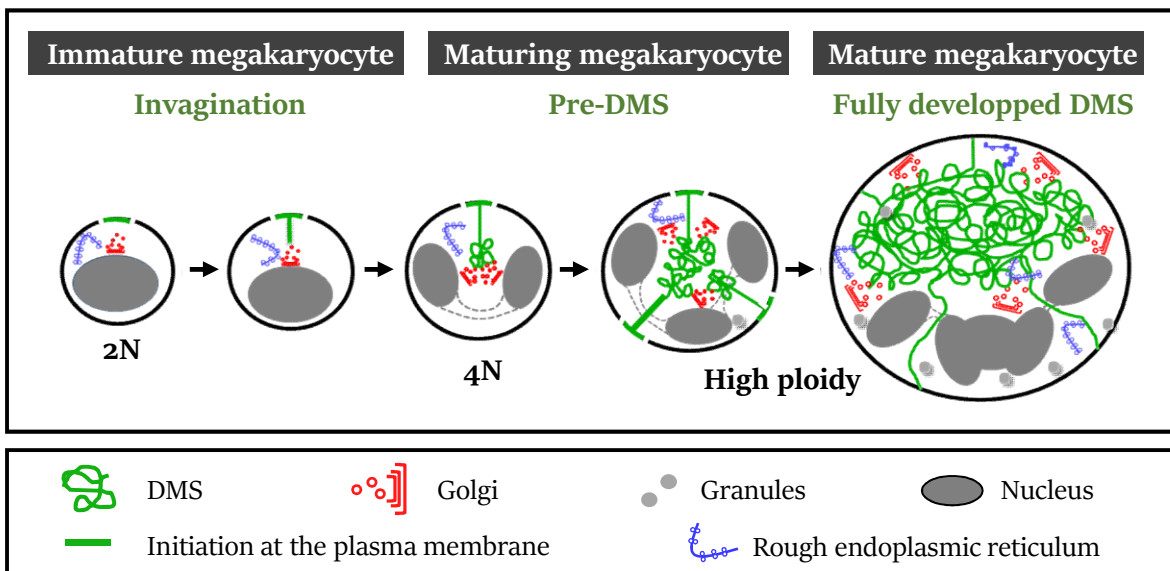


Figure 6 : Développement du DMS au cours de la maturation des mégacaryocytes. Le DMS émerge de la membrane plasmique de la cellule par invaginations progressives et ce, de manière concomitante au processus de ploïdisation. Les invaginations forment d'abord un pré-DMS, qui se loge dans la région périnucléaire et qui sera ensuite alimenté en membranes par le Golgi et en lipides par le réticulum endoplasmique. Adapté de Eckly et al, 2014.

b. Développement du système de membrane interne :

Formation. Le système de membrane interne, appelé « demarcation membrane system » (DMS), fut pour la première fois décrit dans les années 1950 (Kautz and De Marsch, 1955). Il forme un réseau complexe de membranes entremêlées, qui constituent un réservoir indispensable à l'élaboration des plaquettes (Radley and Haller, 1982). Il était initialement admis, sur la base d'observations réalisées par microscopie électronique à transmission, que le DMS délimitait les futures plaquettes avant qu'elles ne soient libérées dans la circulation sanguine. En effet, le DMS délimite de multiples territoires cytoplasmiques, évoquant des plaquettes préformées (**Figure 5**) (Behnke, 1968). Nous verrons comment cette hypothèse fut abandonnée au profit d'un processus plus complexe. Le DMS est continu avec la membrane plasmique (Behnke, 1968; Mahaut-Smith et al., 2003), de laquelle il émergerait par invagination progressive et ce, de façon concomitante au processus de polyploïdisation. Il formerait d'abord une première invagination, appelée pré-DMS, qui se localiserait près du noyau et qui serait ensuite alimentée en membranes par des vésicules venant de l'appareil de Golgi (**Figure 6**) (Eckly et al., 2014). En effet, désassembler l'appareil de Golgi à l'aide du composé chimique Brefeldine-A ralentit la formation du DMS des mégacaryocytes en culture. Bien que ceci n'ait pas encore été formellement démontré, l'apport en lipides pourrait être complémenté par le réticulum endoplasmique, qui est physiquement très proche du pré-DMS (<25 nm). Le développement d'une telle quantité de membranes pose la question de l'origine des lipides qui pourraient, en partie, provenir des adipocytes de la moelle (Valet et al., 2020). Des résultats préliminaires semblent également indiquer que la synthèse *de novo* de lipides par les mégacaryocytes ait un rôle dans leur différenciation car inhiber certaines enzymes de cette voie, comme la fatty acid synthase, perturberait leur maturation (Barrachina et al, 2020). Davantage d'études seront toutefois nécessaires pour évaluer en détail l'importance du métabolisme des lipides dans la mégacaryopoïèse.

Protéines impliquées dans la formation du DMS. Bien que le DMS fut observé il y a plus de 70 ans, les acteurs impliqués dans sa formation restent encore mal connus. Des protéines de la famille F-BAR, qui remodelent les membranes en interagissant avec le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (Frost et al., 2009), ont toutefois été proposées pour y participer. Parmi elles, la protéine CIP4 dont l'inactivation chez la souris bloque le développement du DMS et entraîne une thrombopénie

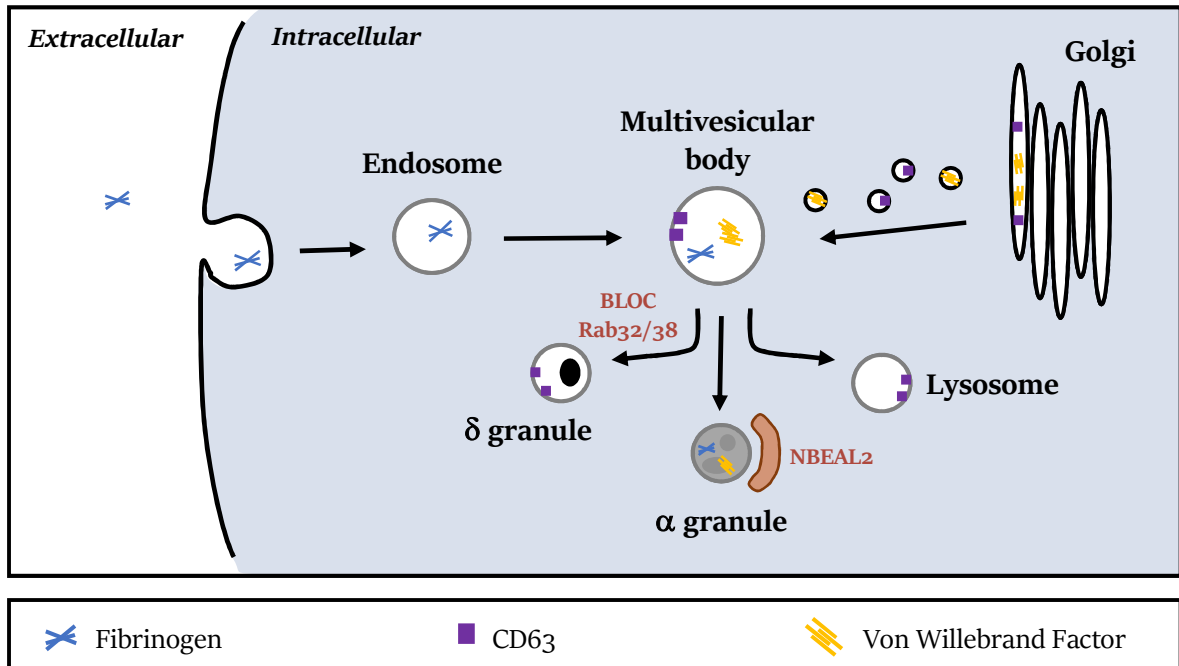


Figure 7 : Biogenèse des granules plaquettaires. Les granules α , les granules δ ainsi que les lysosomes sont issus d'un seul et unique précurseur endosomal commun, à savoir le multivesicular body. Il est alimenté en protéines via i) des vésicules provenant de l'appareil de Golgi, comme dans le cas du facteur Willebrand ou du CD63, et ii) par la voie endosomale comme dans le cas du fibrinogène, qui est récupéré par les mégacaryocytes depuis le milieu extérieur. Les mécanismes d'adressage des protéines depuis le multivesicular body jusqu'aux différents types de granules restent mal connus. Pour les granules α , il impliquerait la protéine NBEAL2, qui permet de maintenir les vésicules dans le cytoplasme de la cellule et d'empêcher leur exocytose. Pour les granules δ , il impliquerait les complexes BLOC ainsi que les GTPases Rab32 et Rab38.

(baisse de la numération plaquettaire) (Chen et al., 2013). En plus d'interagir avec les lipides, les protéines F-BAR lient également de nombreux partenaires protéiques associés au cytosquelette d'actine tels que la Filamine A, qui stabilise et ancre les microfilaments à la membrane plasmique (Rosa et al., 2019). La protéine PACSIN2 fut ainsi rapportée pour s'associer à la Filamine A soluble dans la lignée plaquettaire, et ce duo serait impliqué dans la formation du DMS chez la souris (Begonja et al., 2015). Bien que les résultats doivent encore être confirmés par invalidation génique de PACSIN2, ils pourraient expliquer l'ultrastructure anormale et resserrée du DMS des mégacaryocytes murins déficients pour la Filamine A (Begonja et al., 2015). Par extension, ils pourraient expliquer pourquoi l'absence du complexe GPIIb-V-IX, qui interagit aussi avec la Filamine A, perturbe la formation du DMS chez la souris (Poujol et al., 2002; Strassel et al., 2009).

c. Formation des granules plaquettaires :

Synthèse. Les précurseurs mégacaryocytaires développent au cours de leur maturation deux types de granules spécialisés : les granules alpha (α) et les granules denses (δ) (Sharda and Flaumenhaft, 2018). Alors que l'importance fonctionnelle de ces granules est déjà établie, les processus permettant leur biogenèse restent à l'inverse mal caractérisés. Les granules α et δ proviennent, tout comme les lysosomes, d'un précurseur endosomal commun, le *multivesicular body* (Figure 7). Il renferme le Facteur Willebrand qui sera restreint aux granules α , ou encore la tétraspanine CD63 qui sera retrouvée dans la membrane des granules δ et les lysosomes (Heijnen et al., 1998). Les mécanismes permettant la répartition et l'adressage spécifique de chaque protéine dans un type de granule particulier restent inconnus. Il est à noter qu'une fraction des protéines ou molécules retrouvées dans les granules ne sont pas directement synthétisées par le mégacaryocyte lui-même. L'un des exemples est le fibrinogène des granules α qui est synthétisé par les hépatocytes, sécrété dans le fluide sanguin puis récupéré par le mégacaryocyte par endocytose via l'intégrine α IIb β 3 (Handagama et al., 1993).

Protéines impliquées dans la formation des granules. La majorité des acteurs impliqués dans la biogenèse des granules plaquettaires fut identifiée par le biais d'études génétiques chez des patients atteints de syndromes hémorragiques associés à des déficits quantitatifs ou qualitatifs granulaires, aussi appelés *storage pool diseases*. La majorité de ces pathologie n'affecte toutefois qu'un seul type

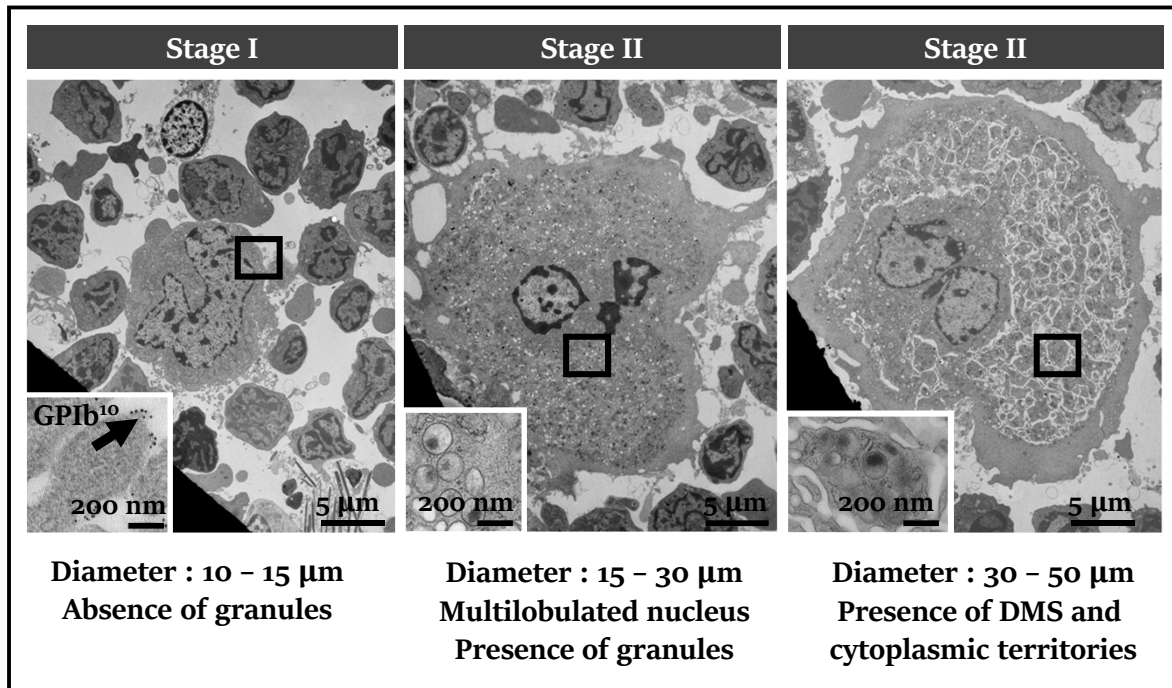


Figure 8 : Les différents stades de maturation des précurseurs mégacaryocytaires. Il est possible de distinguer trois intermédiaires de maturation *in situ* sur coupe de moelle, sur la base de critères morphologiques observables tels que le diamètre, l'aspect du noyau, la présence de granules et de DMS. Pour chacun des stades, des images représentatives par microscopie électronique à transmission sont présentées, sous lesquelles sont indiqués leurs critères d'identification. Dans le cas du stade I, l'encart du coin inférieur gauche indique par marquage aux billes d'or l'expression de la sous-unité GPIb β (CD42c) du complexe GPIb-V-IX, spécifique de la lignée mégacaryocytaire. Dans le cas du stade II, l'encart révèle quant à lui la présence de granules plaquettaires. Enfin dans le cas du stade III, l'encart montre un territoire cytoplasmique. Adapté de Eckly et al, 2012.

de granules, ce qui suggère l'existence d'acteurs et de voies de biogenèse distincts en aval du précurseur endosomal commun (Dupuis et al., 2020; Nurden and Nurden, 2007). Fut ainsi identifié le gène NBEAL2, dont les mutations chez l'Homme sont responsables d'une pathologie héréditaire récessive appelée syndrome des plaquettes grises (Kahr et al., 2011). Le syndrome tire son nom de l'aspect pâle et grisâtre des plaquettes sur frottis colorés au May-Grünwald, traduisant une absence de granules α (les granules δ étant normaux). Les souris déficientes pour cette protéine récapitulent le phénotype des patients (Kahr et al., 2013), et ont révélé que la protéine NBEAL2 était impliquée dans la rétention des protéines synthétisées par le mégacaryocyte et/ou endocytosées dans les granules α matures (Lo et al., 2018). Pour les granules δ , de nombreuses protéines ont été impliquées dans leur biogenèse. Elles forment notamment des complexes BLOC (biogenesis of lysosome-related organelles complex) dont les mutations provoquent chez l'Homme un ensemble de pathologies héréditaires récessives appelé syndrome d'Hermansky-Pudlak (Dupuis et al., 2020; Spritz et al., 2003). Le syndrome se caractérise par une absence de granules δ plaquettaire ainsi que d'un albinisme oculocutané, qui témoigne d'un déficit en mélanosomes, des proches cousins des granules δ . La contribution exacte des complexes BLOC dans la biogenèse des granules est cependant mal connue. Ils pourraient impliquer les protéines GTPases Rab32 et Rab38 avec qui ils interagissent, et dont la double inactivation chez la souris récapitule un phénotype Hermansky-Pudlak (Aguilar et al., 2019).

d. La classification des précurseurs mégacaryocytaires :

Il est possible de distinguer par microscopie électronique à transmission sur des coupes de moelle, trois intermédiaires de maturation des précurseurs mégacaryocytaires (**Figure 8**). Leur classification est basée sur la taille de la cellule, la morphologie de son noyau ainsi que l'aspect et le contenu du cytoplasme (Eckly et al., 2012; Levine et al., 1982). Les mégacaryocytes de classe I, appelés mégacaryoblastes, sont les plus petits avec un diamètre de 10 à 15 μm . Ils présentent un rapport nucléocytoplasmique important, témoignant d'un cytoplasme immature et peu développé, dénué de granules ainsi que de DMS. Les protéines spécifiques à la lignée mégacaryocytaire, comme le complexe GPIb-V-IX, commencent toutefois à être exprimées. Les mégacaryocytes de classe II, aussi appelés promégacaryoblastes, ont une taille intermédiaire d'environ 15 à 30 μm de diamètre. Les granules plaquettaires font leur apparition, mais le système de membrane interne reste peu développé. Enfin

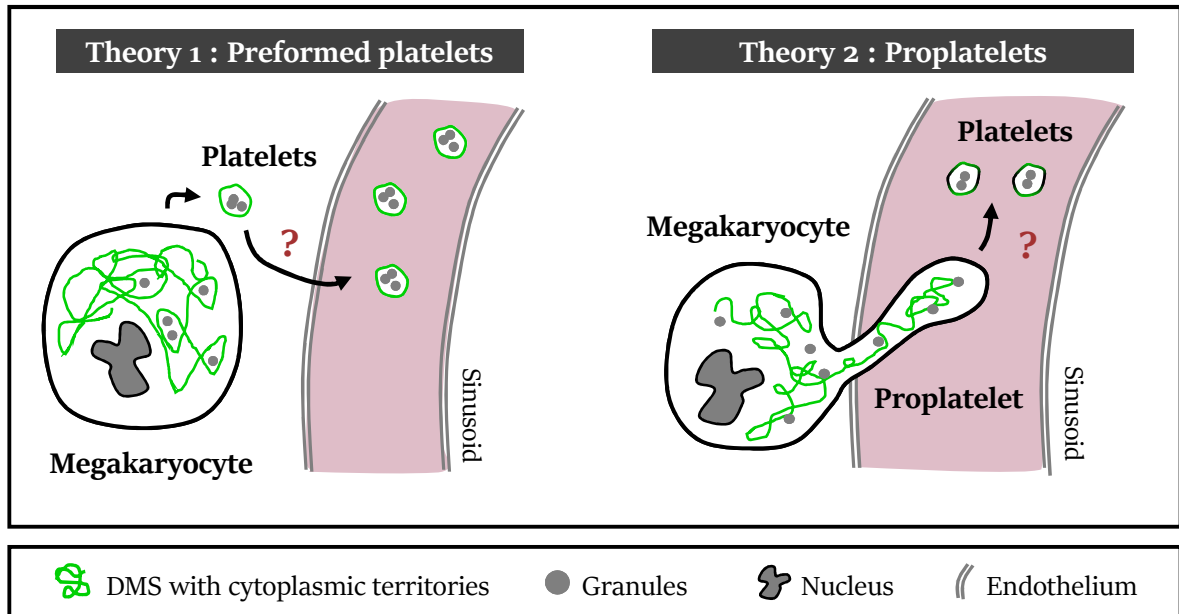


Figure 9 : Les deux théories du mécanisme de thrombopoïèse. (Gauche) La première, qui a été depuis rejetée, reposait sur la notion de plaquettes préformées au sein du DMS. Une fois mature, le mégacaryocyte se fragmenterait et relarguerait ces plaquettes fonctionnelles dans le parenchyme médullaire, qui rejoindraient ensuite la circulation sanguine. (Droite) La deuxième, qui a été depuis largement adoptée par la communauté, repose sur l'extension de longues protrusions cytoplasmiques, les proplaquettes, qui pénètrent l'endothélium jusqu'à la lumière du vaisseau pour libérer les plaquettes dans le sang. Les mécanismes aboutissant à la formation de plaquettes fonctionnelles à partir de proplaquettes sont encore mal compris.

le stade III correspond aux mégacaryocytes matures, dont la taille peut atteindre jusqu'à 60 μm de diamètre. Ils présentent un cytoplasme développé renfermant des centaines de granules ainsi que du DMS, et une zone périphérique cytoplasmique sous-membranaire riche en actine et dépourvue d'organelles. Les mégacaryocytes de stade III sont les plus fréquents dans la moelle, pouvant représenter jusqu'à 70% des précurseurs (Eckly et al., 2012). La mégacaryopoïèse est à ce stade achevée, et les mégacaryocytes sont alors prêts pour le processus final de génération de plaquettes, la thrombopoïèse.

3. Les mégacaryocytes matures :

Les mégacaryocytes matures de la moelle sont des cellules sessiles. Ils sont localisés près de petits vaisseaux médullaires, les sinusoides (Stegner et al., 2017), dans lesquels ils émettront les futures plaquettes par le processus de thrombopoïèse.

a. Historique et hypothèses :

Deux théories historiques. Le mécanisme de libération des plaquettes dans la circulation sanguine est historiquement très controversé. Deux hypothèses s'affrontaient sur la base de clichés réalisés sur des coupes de moelle par microscopie électronique à transmission. La première proposait une fragmentation des mégacaryocytes dans le tissu médullaire, libérant les plaquettes préformées par le DMS qui passent alors dans la circulation (Yamada, 1957). La deuxième impliquait l'extension de larges protrusions cytoplasmiques dénuées de matériel nucléaire, les proplaquettes (**Figure 9**). Elles pénétreraient dans la lumière des sinusoides, où elles se fragmenteraient ensuite pour donner naissance aux plaquettes sanguines (Becker and De Bruyn, 1976). Les deux hypothèses s'opposent par conséquent sur le concept de plaquettes préformées par le DMS, et sur la formation d'intermédiaires cytoplasmiques proplaquettaires. Il faudra toutefois attendre les années 1990 et la découverte de la thrombopoïétine avant de progresser sur cette question. La cytokine permet de développer des systèmes de culture de mégacaryocytes à partir de progéniteurs hématopoïétiques de la moelle, donnant accès à de larges quantités d'un type cellulaire autrement très rare (Debili et al., 1995). Dans ces conditions, les mégacaryocytes émettent de fines extensions rappelant les proplaquettes observées *in situ* dans la moelle, qui sont capables de générer des plaquettes (Choi et al., 1995; Do Sacramento

et al., 2020). Depuis, l'émission de proplaquettes fut confirmée *in vivo* chez la souris par des techniques de microscopie intravitale biphotonique (Bornert et al., 2021; Junt et al., 2007). Il est important de noter que, plutôt que d'émettre les plaquettes une par une, les proplaquettes sont à l'inverse arrachées dans leur entièreté et relarguées telles que dans la circulation. Elles ne deviendront de véritables plaquettes qu'à l'issue d'une étape de remodelage qui aurait lieu dans la microcirculation pulmonaire, et que nous aborderons plus tard.

Troisième théorie émergente ? Récemment, un nouveau mécanisme de formation des plaquettes a été proposé. Il n'implique ni une fragmentation des mégacaryocytes dans le tissu médullaire, ni l'extension de proplaquettes. Il reposerait sur la formation de bourgeons membranaires à la surface des mégacaryocytes dans la lumière du vaisseau, de taille semblable à celle de plaquettes, qui seraient directement libérés dans la circulation (Potts et al., 2020). Par des techniques d'imagerie photonique et électronique, les auteurs suggèrent qu'un tel mécanisme pourrait contribuer à hauteur de 80% de la production totale plaquettaire. Les résultats sont toutefois sujets à débats, notamment car l'ultrastructure des bourgeons ne fut que très peu abordée. Dans une seconde publication récente, plusieurs groupes se sont attachés à étudier en détail le contenu de ces bourgeons mégacaryocytaires par microscopie électronique à transmission (Italiano et al., 2021). Il s'avère que la grande majorité ne contient aucun des organites plaquettaires majeurs comme les granules α et δ , écartant ainsi la possibilité qu'ils puissent par la suite former de véritables plaquettes sanguines. Il est possible que les bourgeons mégacaryocytaires soient par contre des microvésicules, relarguées dans la circulation, et dont le rôle aujourd'hui n'est que peu élucidé. Face à cette remise en question de la production par bourgeonnement, nous nous baserons dans le reste du document sur le mécanisme de libération des plaquettes dépendant des proplaquettes, qui reste le modèle de référence aujourd'hui.

b. Zoom sur les proplaquettes :

La plupart des connaissances sur les mécanismes de formation des proplaquettes proviennent de mégacaryocytes de culture. Toutefois, il apparaît maintenant que les proplaquettes produites *in vitro* se distinguent très nettement de celles émises par les mégacaryocytes *in vivo*. En effet, les proplaquettes de culture ont une allure plutôt fine (1 μm d'épaisseur), sont ramifiées et présentent à leur

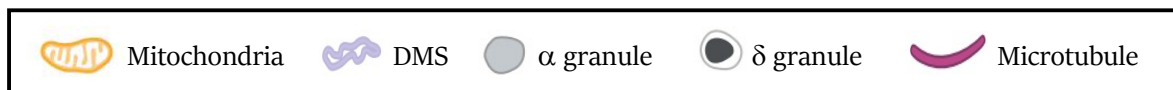
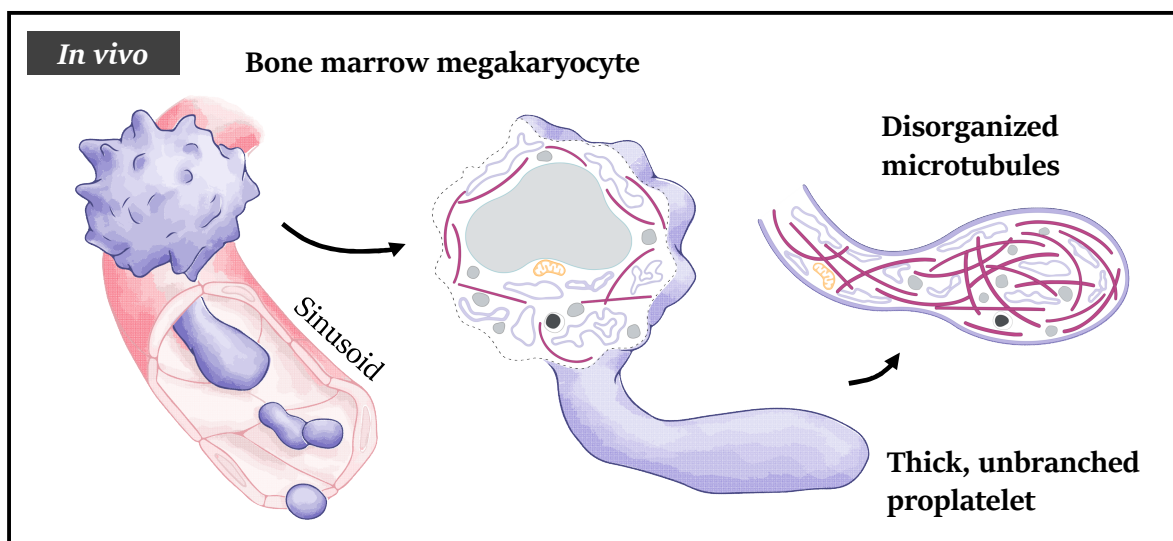
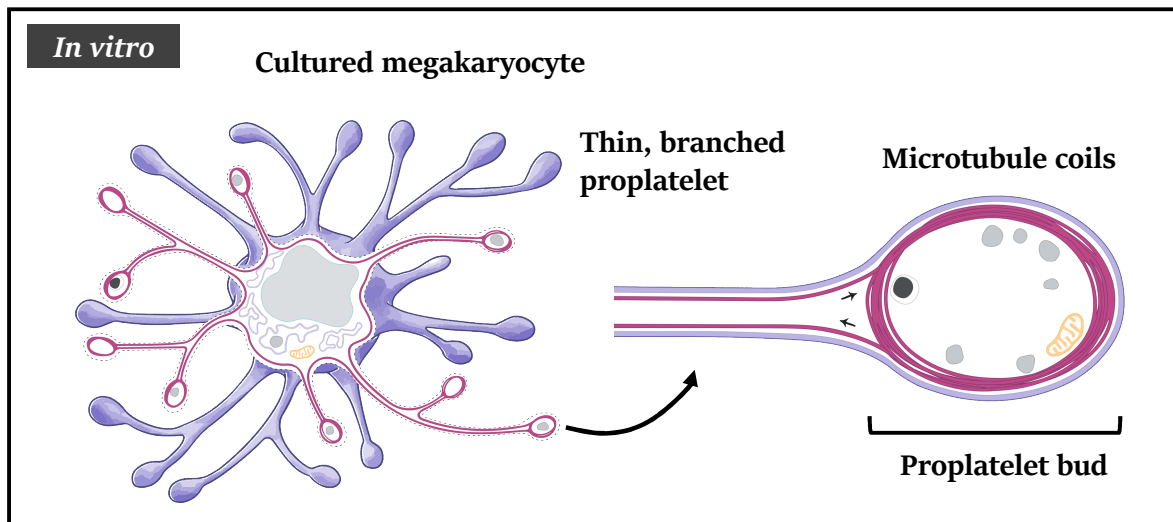


Figure 10 : Proplaquettes de culture (*in vitro*) et proplaquettes formées dans la moelle (*in vivo*). (Haut) Les proplaquettes émises par les mégacaryocytes de culture prennent l'apparence de fines et longues protrusions cytoplasmiques très ramifiées. Elles sont traversées dans leur longueur par des faisceaux de microtubules, qui participent à son élongation et qui s'enroulent à son extrémité, formant un bourgeon proplaquettaire. (Bas) Les proplaquettes émises par les mégacaryocytes de la moelle sont à l'inverse 4 à 5 fois plus épaisses et non ramifiées. Elles présentent un réseau de microtubules désorganisés qui ne s'enroulent pas. Par ailleurs, les microtubules n'assurent ici pas l'élongation des proplaquettes, mais fournissent plutôt un soutien structurel sans quoi la proplaquette se rétracterait. Dessins réalisés par Tatjana Hirschmugl.

extrémité un renflement dans lequel le cytosquelette de microtubules s'enroule. Par opposition, les proplaquettes générées dans la moelle sont épaisses (5 μm d'épaisseur), non ramifiées et montrent un cytosquelette désorganisé sans enroulement de microtubules (**Figure 10**) (Bornert et al., 2021). De plus, les mécanismes conduisant à leur formation sont différents selon qu'ils sont observés dans un contexte *in vitro* ou *in vivo*. En effet, pour les mégacaryocytes de culture, les microtubules sont nécessaires et suffisants pour étendre les proplaquettes : ils forment des faisceaux, qui glissent les uns sur les autres par le biais d'une protéine associée aux microtubules (la dynéine), poussant ainsi sur la membrane afin d'allonger la protrusion (Bender et al., 2015). Les microfilaments d'actine servent quant à eux à la ramification de cette structure (Italiano et al., 1999). Par opposition, *in vivo*, les microtubules ne permettent pas l'élongation de la proplaquette, mais servent plutôt de soutien structurel (Bornert et al., 2021). De son côté, l'actine exercerait, par l'intermédiaire de la myosine IIA, une force contractile qui permet aux proplaquettes de conserver leur intégrité sous l'action tractrice du flux sanguin. De manière générale, de telles différences structurelles et mécanistiques remettent aujourd'hui en question la pertinence des approches *in vitro* dans l'étude de la thrombopoïèse. Il est ainsi possible que des mécanismes autrement dispensables *in vivo* soient davantage mis en avant et aient plus d'importance *in vitro*, ne reflétant ainsi pas la réalité du processus. Nous atteignons par conséquent une des limites des méthodes de culture actuelles, qu'il faudra nécessairement adapter pour inclure les conditions hémodynamiques retrouvées dans les vaisseaux sinusoïdes de la moelle. Des efforts sont en œuvre par plusieurs équipes de recherche, dont notre laboratoire, pour intégrer ce paramètre dans des dispositifs biomimétiques de libération de plaquettes (Blin et al., 2016; Dunois-Lardé et al., 2009; Ito et al., 2018; Thon et al., 2014; Tozzi et al., 2018).

c. Le processus de thrombopoïèse :

Initiation et élongation de la proplaquette. La première étape du processus consiste en l'initiation et au passage de l'extension au travers de l'endothélium des sinusoïdes de la moelle. Elle est réalisée par l'intermédiaire de structures d'adhérences comparables à des podosomes, qui forment des pores transendothéliaux (sans toutefois perdre l'intégrité vasculaire) (Eckly et al., 2020). La suite d'évènements permettant au podosome de devenir une proplaquette ainsi que les mécanismes impliqués

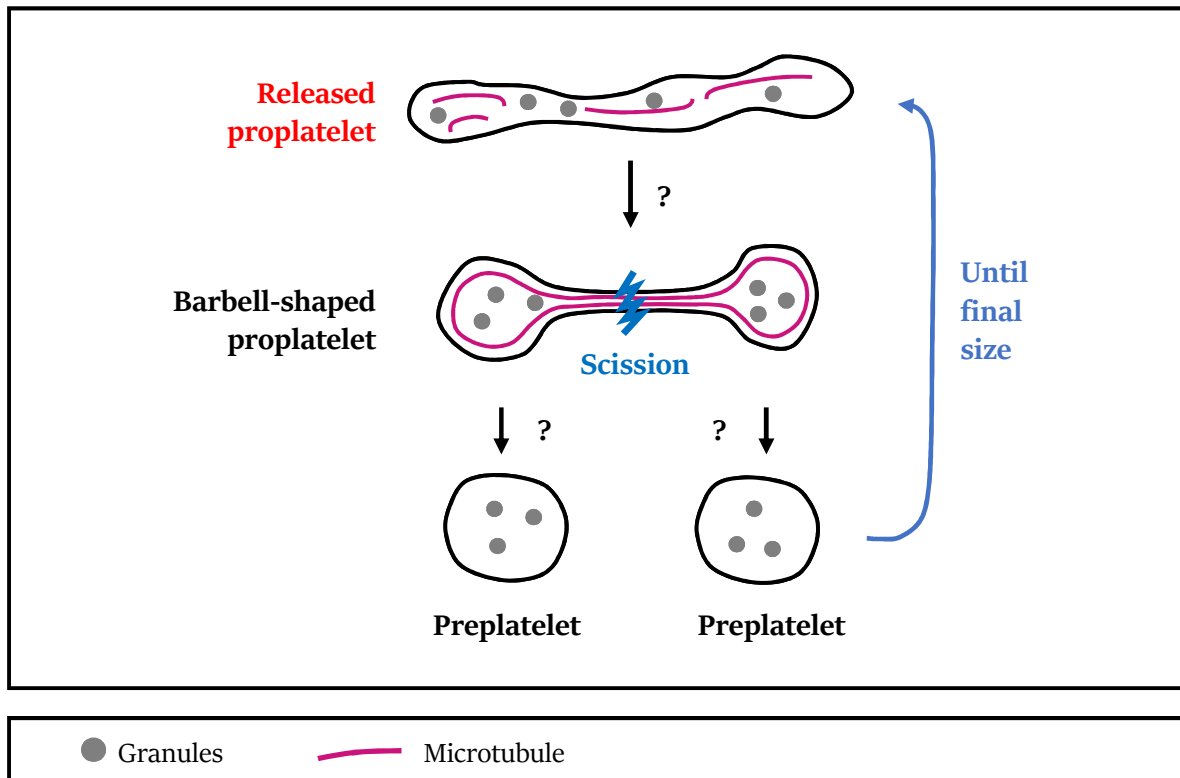


Figure 11 : De la proplaquette à la plaquette, un remodelage dans la microcirculation. D'après le modèle bio-informatique de Thon et al, 2012, le remodelage des proplaquettes libérées dans la circulation sanguine en plaquettes impliquerait des événements successifs de fragmentation, qui seraient eux-mêmes en partie contrôlés par les microtubules. Dans la proplaquette, ils formeraient plusieurs faisceaux sous-membranaires, qui se resserreraient au niveau de la partie centrale de la proplaquette par l'intermédiaire de MAPs encore inconnues, possiblement motrices (kinésines, dynéines). Le mécanisme entraînerait la formation d'intermédiaires en forme d'haltère, dont la zone resserrée centrale constituerait un point de rupture où la fragmentation aurait ensuite lieu. Il en résulterait alors la formation de préplaquettes, qui se convertiraient en proplaquettes en s'allongeant et qui recommenceraient le cycle jusqu'à atteindre la taille finale d'une plaquette. Adapté de Thon et al, 2012.

dans son élongation restent toutefois mal connus. Mis à part le cytosquelette, les conditions hydrodynamiques du fluide sanguin semblent favoriser le processus (Junt et al., 2007). Le flux exercerait notamment une action tractrice sur les proplaquettes qui, alimentées en membranes par fusion avec le DMS (Brown et al., 2018), s'étendent alors dans la lumière du sinusoiide. Le flux serait également impliqué dans la fragmentation des proplaquettes dans la circulation. En particulier, une fois étendues, les proplaquettes perturberaient l'écoulement de fluide sanguin. Elles créeraient notamment des zones de perturbations locales dans un fluide autrement laminaire, ce qui favoriserait leur arrachement et donc la thrombopoïèse. Bien que son mode d'action soit encore peu décrit, en plus d'un stress mécanique, la turbulence permettrait la sécrétion de facteurs solubles par les mégacaryocytes qui agiraient de façon autocrine pour permettre la fragmentation des proplaquettes (Ito et al., 2018). Il est important de noter qu'une fois libérées dans la circulation, les proplaquettes ne deviendront de véritables plaquettes qu'à l'issue d'une étape additionnelle de remodelage dans la microcirculation pulmonaire.

Remodelage des proplaquettes. Il fut rapporté, dès les années 1940, que la numération plaquettaire était plus basse en entrée qu'en sortie de la circulation pulmonaire, suscitant alors l'intérêt pour cet organe dans le processus de thrombopoïèse (Howell and Donahue, 1937). Le remodelage des proplaquettes dans le poumon ne fut toutefois réellement observé que bien plus tard par microscopie intravitale (Lefrançais et al., 2017). En utilisant des lignées exprimant la GFP uniquement dans les mégacaryocytes et les plaquettes, il fut montré l'arrivée de proplaquettes (et parfois de mégacaryocytes entiers) dans le lit pulmonaire, où ils se fragmentaient alors. Les observations indiquent ainsi que les proplaquettes se divisent progressivement lors de leur passage dans le poumon. Des études *ex vivo* et *in silico* suggèrent par ailleurs que le phénomène de fragmentation des proplaquettes serait en partie dépendant du cytosquelette de microtubules. Il permettrait la torsion des proplaquettes en leur milieu, formant une sorte d'haltère dont la partie centrale resserrée constituerait un point de rupture où la fragmentation aurait lieu (Thon et al., 2012) (**Figure 11**). Le processus se répèterait jusqu'à ce que les fragments atteignent la taille finale d'une plaquette, taille qui serait là-encore dictée par le cytosquelette, notamment les microtubules. Les acteurs et les mécanismes exacts impliqués

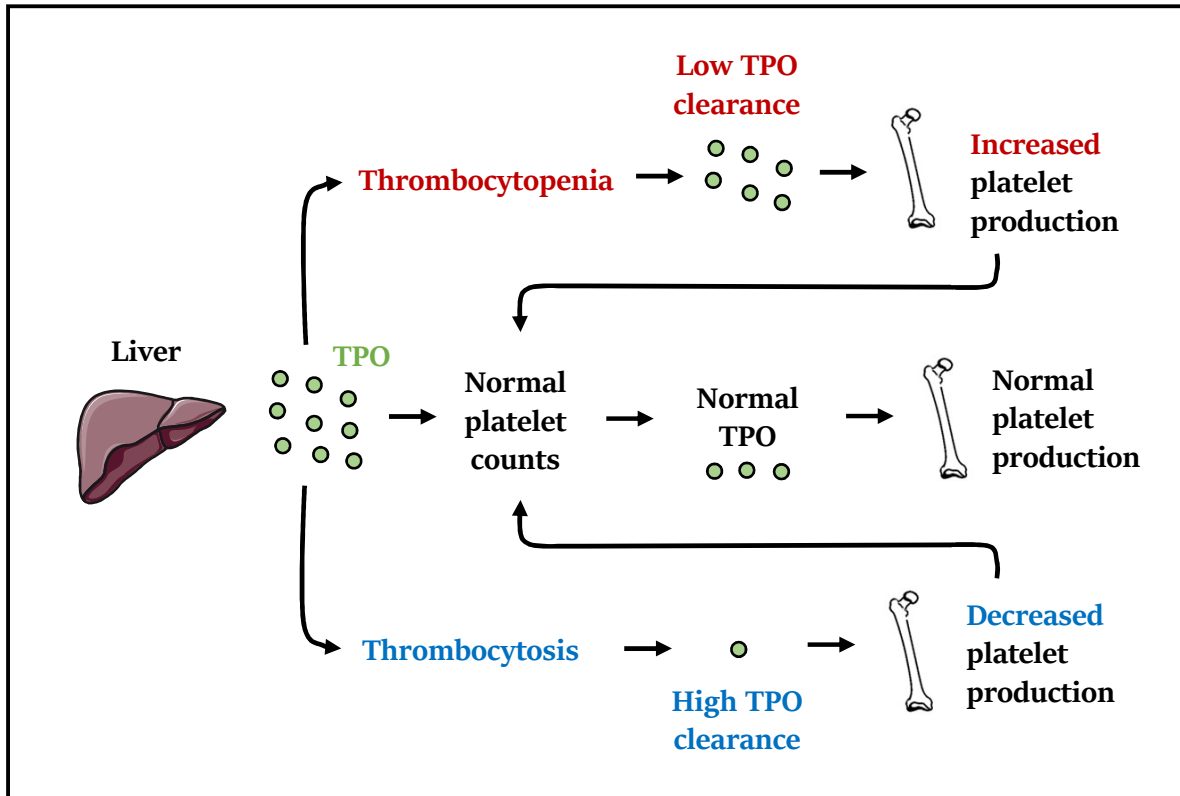


Figure 12 : La boucle de régulation de la masse plaquettaire par la thrombopoïétine. La thrombopoïétine (TPO) est produite par le foie, qui la sécrète dans le fluide sanguin. Les plaquettes peuvent fixer et internaliser cette hormone, si bien qu'elles contrôlent directement la quantité de thrombopoïétine circulante et donc sa propre biogenèse. En cas de baisse de la numération plaquettaire, la concentration de thrombopoïétine circulante augmente. Elle pourra alors stimuler la mégacaryopoïèse dans la moelle osseuse, rétablissant ainsi un chiffre plaquettaire et des niveaux normaux de thrombopoïétine circulante. Dans le cas inverse, le surplus de plaquettes liera et internalisera davantage de thrombopoïétine qu'à la normale, diminuant ainsi la quantité d'hormone circulante. Par conséquent, la production plaquettaire ralentit, rétablissant un chiffre plaquettaire et des niveaux de thrombopoïétine normaux. Adapté de De Graaf and Metcalf, 2011.

dans ce processus restent toutefois encore inconnus. L'hypothèse est toutefois appuyée par l'observation, dans des poumons de souris ayant été transfusées avec des plaquettes de culture (qui n'ont pas encore été remodelées), d'éléments plaquettaire en forme d'haltère (Do Sacramento et al., 2020).

4. Régulation de la production plaquettaire :

a. Les facteurs extrinsèques :

La thrombopoïétine. L'une des cytokines les plus importantes dans la production plaquettaire est la thrombopoïétine, une hormone de nature glycoprotéique qui stimule fortement la mégacaryopoïèse. Elle est synthétisée par les hépatocytes, et dans une moindre mesure, dans les reins (Geddis et al., 2002). Les premiers indices de l'existence de cette hormone furent rapportés au début des années 1960 par l'hématologue hongrois Endre Kelemen. Il remarqua une forte augmentation du chiffre plaquettaire (thrombocytose) chez des souris ayant reçu du sérum de rongeurs préalablement exsanguinés ou de patients ayant subi une forte hémorragie (Kelemen et al., 1963). Pour réconcilier ses résultats, il suspecta alors la présence d'un facteur soluble plasmatique stimulant la production plaquettaire suite à une hémorragie massive. Le facteur plasmatique de Kelemen, plus tard renommé thrombopoïétine, sera finalement cloné et caractérisé 30 ans plus tard (Lok et al., 1994). Il agit par l'intermédiaire de son récepteur, le c-mpl (Vigon et al., 1992), retrouvé à la surface des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques, des mégacaryocytes et des plaquettes (Ninos et al., 2006; Solar et al., 1998). Dès que la thrombopoïétine se lie au c-mpl, une signalisation se met alors en place, impliquant notamment les voies JAK2-STAT3/5, des MAP kinases et PI3K-Akt (Kaushansky, 2005). Il est à noter que la voie JAK-STAT est particulièrement importante pour la transduction du signal en aval du récepteur. En effet, une activation constitutionnelle de JAK2 causée par la mutation V617F peut entraîner des néoplasmes myeloprolifératifs, un ensemble de maladies clonales pouvant se caractériser par une thrombocytose (Ortmann et al., 2015; Skoda et al., 2015).

Régulation de la mégacaryopoïèse. Pour maintenir une production plaquettaire stable, la concentration de thrombopoïétine circulante est régulée par une boucle de rétrocontrôle négative, dont l'activité est inversement proportionnelle au chiffre plaquettaire (Figure 12). L'importance de cette

hormone et de son récepteur est illustrée chez les souris déficientes pour l'une ou l'autre des protéines, qui montrent chacune une diminution d'environ 90% de la numération plaquettaire (Murone et al., 1998). Pour assurer la biogenèse des plaquettes, la thrombopoïétine agirait à deux niveaux, à savoir i) sur les cellules souches hématopoïétiques car, en son absence, la population disparaît progressivement avec l'âge (Qian et al., 2007); et ii) sur les progéniteurs et précurseurs mégacaryocytaires, stimulant leur prolifération et favorisant leur ploïdisation en induisant l'expression de la cycline E (Eliades et al., 2010; de Sauvage et al., 1996). Elle est aujourd'hui utilisée dans le traitement symptomatique des thrombopénies auto-immunes sévères afin de remonter le chiffre plaquettaire et réduire le risque de saignement, commercialisée sous forme d'un analogue synthétique appelé Romiplostim (Snell Taylor et al., 2021). Dans un contexte plus expérimental, elle peut être utilisée dans des modèles murins de thrombopénie afin de remonter leur numération (Léon et al., 2012; McElroy et al., 2015). La thrombopoïétine n'est toutefois pas la seule cytokine à promouvoir la mégacaryopoïèse, car les souris déficientes pour l'hormone ou pour son récepteur maintiennent une numération plaquettaire minimale. D'autres facteurs solubles peuvent ainsi stimuler le processus, comme les interleukines IL3 et IL6, produites par les cellules immunitaires. Leur injection chez la souris provoque une hausse du chiffre plaquettaire, accompagnée d'une augmentation de la taille et de la ploïdie des mégacaryocytes (Carrington et al., 1991). Un deuxième acteur est le Stem Cell Factor, produit par les cellules stromales de la moelle qui promeut, avec la thrombopoïétine ou l'IL6, la prolifération des progéniteurs mégacaryocytaires *in vitro* (Broudy et al., 1995; Lazzari et al., 2000).

Régulation de la thrombopoïèse. Bien que la thrombopoïétine stimule la mégacaryopoïèse, il est à noter qu'elle n'impacte toutefois pas la thrombopoïèse (Ito et al., 1996). L'un de facteurs clé dans ce processus final est le collagène matriciel de l'environnement médullaire. En particulier, le collagène de type IV, qui constitue la membrane basale des vaisseaux sinusoides, stimule l'émission des proplaquettes par les mégacaryocytes de culture issus de la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques humains (Balduini et al., 2008). Par opposition, le collagène de type I, qui se localise plutôt dans le stroma médullaire, inhibe le processus. Le mécanisme d'inhibition par le collagène I serait dépendant de la glycoprotéine GPVI (Semeniak et al., 2016), et pourrait de cette façon permettre un

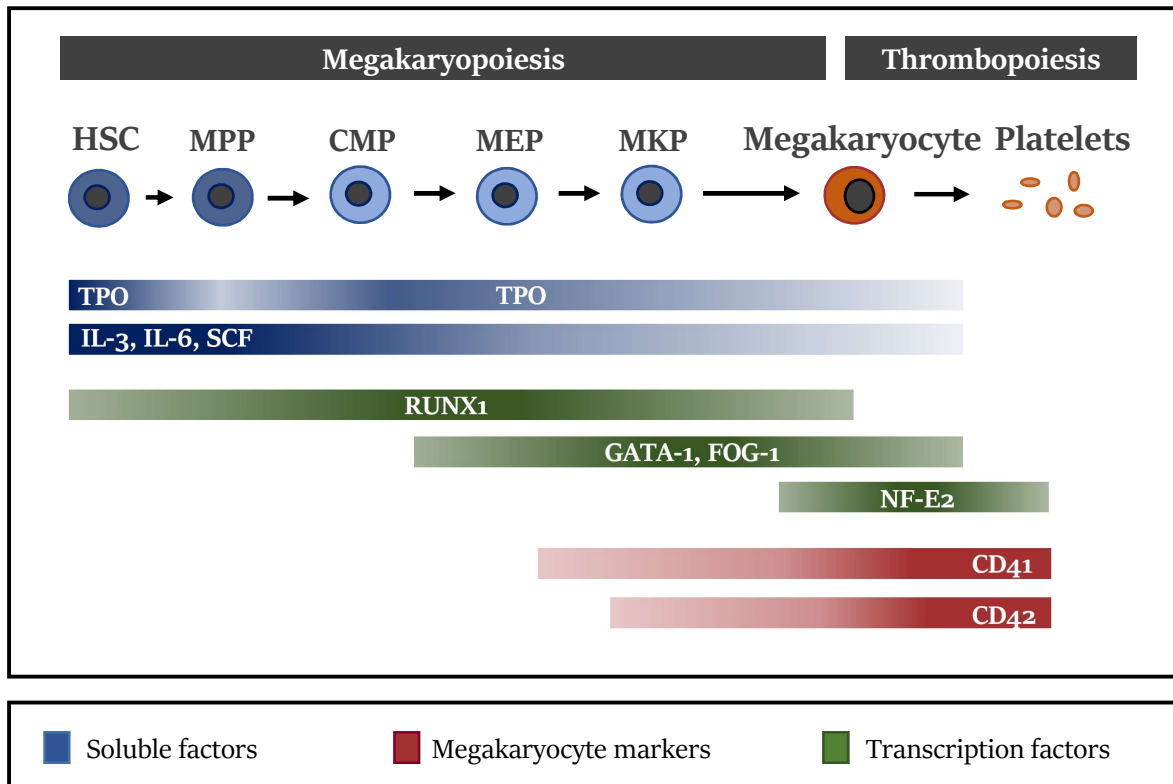


Figure 13 : La régulation de la mégacaryopoïèse. Le processus de mégacaryopoïèse est très finement régulé par une multitude de facteurs extrinsèques. La thrombopoïétine (TPO) est l'un des facteurs les plus importants, favorisant le processus depuis la cellule souche hématopoïétique jusqu'aux mégacaryocytes. D'autres facteurs solubles peuvent être impliqués comme les interleukines 3 et 6, ou encore le Stem Cell Factor, qui stimulent également le processus. En réponse aux différents stimuli extérieurs, de nombreux facteurs de transcription feront progressivement leur apparition dans les cellules afin d'assurer leur engagement et différenciation en mégacaryocytes, parmi lesquels RUNX1, GATA-1 ou encore NF-E2. Ils permettront notamment l'acquisition de marqueurs spécifiques de la lignée plaquettaire, tels que CD41 et CD42, essentiels dans leurs fonctions hémostatiques. Schéma réalisé par François Lanza. Abréviations: HSC, Hematopoietic Stem Cell; MPP, MultiPotent Progenitor; CMP, Common Myeloid Progenitor; MEP, Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor; MKP, Megakaryocyte Precursor.

contrôle géographique de l'émission des proplaquettes. Nous noterons toutefois que les souris déficientes pour la GPVI présentent une numération plaquettaire normale (Semeniak et al, 2019), suggérant d'éventuels mécanismes de compensations (encore inconnus) *in vivo*.

b. Les facteurs intrinsèques :

Pour assurer et orchestrer la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en mégacaryocytes, plusieurs facteurs de transcription vont faire leur apparition au cours de la mégacaryopoïèse. Initialement, les facteurs de transcription hématopoïétiques furent beaucoup étudiés dans le cadre de l'érythropoïèse (Moi et al., 1994). Étant donné leur origine hématopoïétique commune avec les mégacaryocytes, la plupart de ces facteurs furent également étudiés dans le contexte de la mégacaryopoïèse. Parmi eux RUNX1, GATA1, et NF-E2, sont impliqués dans différentes étapes du processus jusqu'au mégacaryocyte mature (Figure 13).

Runt-related transcription factor (RUNX1) est nécessaire pour la mise en place de l'hématopoïèse chez l'embryon (Wang et al., 1996). L'inactivation constitutive de RUNX1 bloque ainsi l'apparition des cellules souches hématopoïétiques chez la souris, qui finissent par mourir *in utero* d'hémorragies sévères. Pour l'adulte, RUNX1 agit notamment sur le progéniteur bipotent érythro-mégacaryocytaire, réprimant l'expression du facteur de transcription érythrocytaire KLF1, et favorisant son engagement en mégacaryocyte (Elagib et al., 2003; Kuvardina et al., 2015). L'inactivation contrôlée du gène chez la souris, induite après la naissance, provoque ainsi très vite une thrombopénie (Ichikawa et al., 2004). Leurs mégacaryocytes montrent alors des signes de retard de maturation, avec notamment un DMS sous-développé et une nette diminution de la ploïdie *in situ*. L'importance de RUNX1 dans l'endomitose ne sera rapportée que plusieurs années après, impliquant le facteur dans la répression du gène MYH10 (Lordier et al., 2012a). En accord avec les résultats chez la souris, les patients porteurs de mutations RUNX1 peuvent présenter une thrombopénie accompagnée par des risques accrus de saignement liés à des défauts fonctionnels plaquettaires (Songdej and Rao, 2017).

GATA binding protein 1 (GATA1), en association avec son cofacteur Friend of GATA 1 (FOG1), est également nécessaire pour la formation du progéniteur bipotent érythro-mégacaryocytaire (Mancini

et al., 2012). Il permet l'expression de protéines spécifiques aux mégacaryocytes, comme le complexe GPIIb-V-IX (CD42) (Vyas et al., 1999). L'inactivation constitutive de GATA1 chez la souris est létale au stade embryonnaire du fait d'une anémie sévère (Fujiwara et al., 1996). L'inactivation conditionnelle dans la lignée mégacaryocytaire provoque quant à elle une forte thrombopénie chez la souris. Elle s'accompagne d'une prolifération excessive des mégacaryocytes dans la moelle et en culture, qui montrent toutefois un DMS sous-développé et un net déficit quantitatif en granules (Shivdasani et al., 1997). La prolifération excessive des mégacaryocytes déficients pour le facteur GATA1 pourrait indiquer une tentative infructueuse de compensation des défauts de maturation afin d'assurer un chiffre minimal de plaquettes. Pour l'Homme, les individus porteurs de mutations pour GATA1 montrent une thrombopénie pouvant être associée à des saignements, ainsi qu'une anémie plus ou moins sévère (Songdej and Rao, 2017).

Nuclear-Factor Erythroid 2 (NF-E2) est un facteur de transcription dont l'expression est induite en partie par GATA1. NF-E2 est par conséquent un facteur tardif dans le processus de mégacaryopoïèse. L'érythropoïèse des souris inactivées pour NF-E2 n'est ainsi que partiellement affectée, avec une anémie transitoire à la naissance qui s'atténue avec l'âge (Shivdasani and Orkin, 1995). En revanche, les nouveau-nés montrent une thrombopénie très sévère avec un chiffre plaquettaire qui est à peine détectable, et qui entraîne la mort par hémorragie de la très grande majorité des individus (Shivdasani et al., 1995). Pour les souris qui survivent jusqu'à l'âge adulte, malgré leur forte thrombopénie, celles-ci présentent un nombre normal de mégacaryocytes dans la moelle. Les mégacaryocytes déficients présentent toutefois un net déficit quantitatif de granules, et n'émettent pas de proplaquettes en culture ou *in vivo* (Potts et al., 2020; Shivdasani et al., 1995). Leur incapacité à émettre des proplaquettes serait en partie causée par l'absence de tubuline β 1, une sous-unité des microtubules dont le gène est une cible transcriptionnelle du facteur NF-E2. La surexpression de tubuline β 1 par transduction rétrovirale ne permet cependant pas, à elle-seule, de rétablir la formation des proplaquettes en culture (Lecine et al., 2000).

c. La clairance des plaquettes :

Bien que les mécanismes de production de plaquettes conditionnent fortement leur numération, la durée de vie des plaquettes dans le fluide sanguin (≈ 10 jours chez l'Homme et ≈ 5 chez la souris) l'influe tout autant. Production et clairance plaquettaire établissent ainsi un équilibre qui permet de maintenir un chiffre sanguin normal. Les mécanismes de clairance des plaquettes restent toutefois mal compris et reposeraient sur deux processus. Le premier est apoptotique et serait contrôlé par le facteur pro-apoptotique BAK. En particulier, l'inactivation partielle chez la souris de Bcl-XL, un répresseur naturel de BAK, provoque l'apoptose prématurée des plaquettes par la voie caspase-dépendante (Mason et al., 2007). Les auteurs proposèrent alors un modèle d'horloge moléculaire dans lequel la dégradation progressive de Bcl-XL entraîne une clairance des plaquettes vieillissantes. Pour ce qui est du deuxième processus, appelé sénescence, celui-ci est indépendant de l'apoptose (Hoffmeister and Falet, 2016). Il impliquerait plutôt la modification des glycanes de certaines glycoprotéines plaquettaires, notamment de la GPIIb α qui perd ses acides sialiques terminaux (Wang et al., 2021). Les plaquettes désialylées seraient ensuite éliminées par des macrophages spécialisés du foie, les cellules de Kupffer, qu'elles reconnaissent par le biais du récepteur Ashwell-Morell et de la lectine macrophage galactose (Deppermann et al., 2020). Il est à noter que le récepteur Ashwell-Morell est aussi présent à la surface des hépatocytes. Il permettrait, avant la phagocytose des plaquettes désialylées par les macrophages, de stimuler la production de thrombopoïétine, reliant ainsi la clairance plaquettaire à la boucle de rétrocontrôle de cette hormone (Hoffmeister and Falet, 2016).

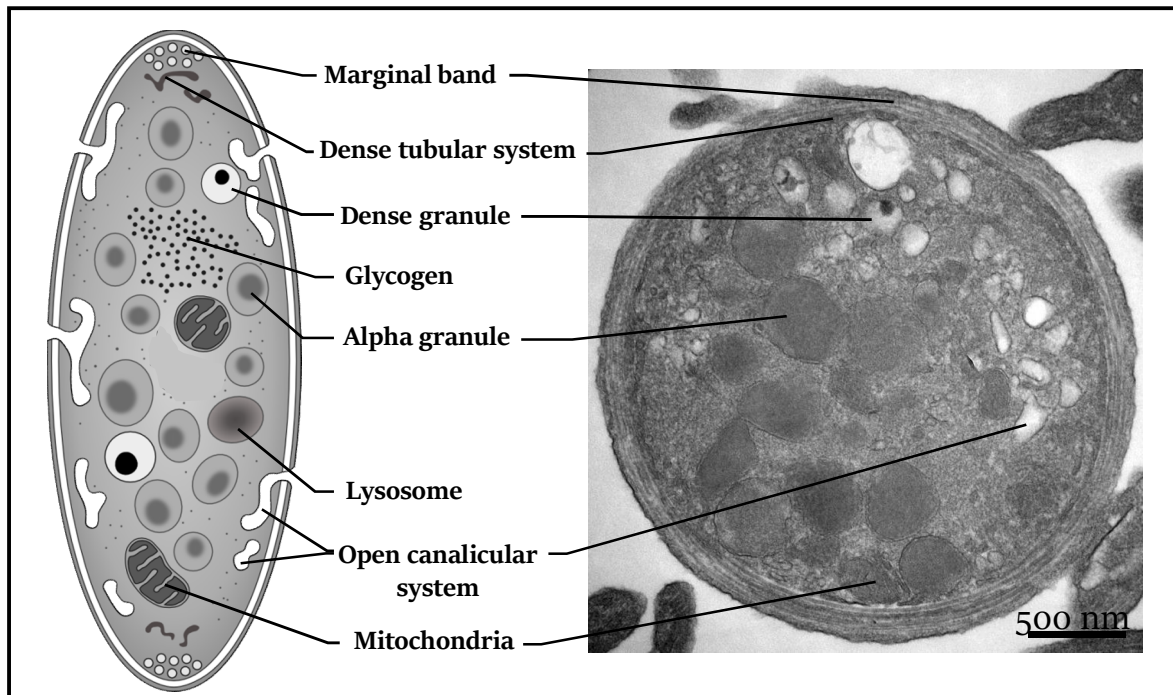


Figure 14 : L'ultrastructure des plaquettes. (Gauche) Représentation schématique en coupe transversale et (Droite) Image représentative par microscopie électronique à transmission en coupe équatoriale, d'une plaquette annotée de ses organites. Adapté de Boneu and Cazenave, 1997. Figure réalisée par Fabien Pertuy.

B. Les fonctions des plaquettes sanguines :

Les plaquettes sont des petits fragments cellulaires anucléés et discoïdes de 2 à 5 μm de diamètre. Leur fonction principale est d'assurer le processus d'hémostase, en permettant l'arrêt des saignements. Lors d'une brèche vasculaire, les plaquettes circulantes adhèrent et agrègent pour former une masse solide, le thrombus, qui limite et arrête les pertes sanguines. Dès l'époque de la Grèce Antique, les philosophes tels qu'Aristote ou Hippocrate avaient déjà remarqué la tendance du fluide sanguin à former des thrombi *ex vivo*. Le phénomène et ses mécanismes sont pendant longtemps restés très mal compris, jusqu'au milieu du XVIII^{ème} siècle avec le chirurgien français Jean-Louis Petit (Riddel et al., 2007). Il remarqua en effet, lors d'une chirurgie d'amputation, que des thrombi se formaient également *in vivo*, au cœur-même des vaisseaux sanguins lésés. Les travaux pionniers de Max Schultze et de Giulio Bizzozero un siècle plus tard permirent d'identifier les plaquettes comme l'un des contributeurs majeurs des thrombi et du processus d'hémostase, qui est aujourd'hui bien décrit (Gale, 2011; Versteeg et al., 2013). Dans cette partie, nous ferons un tour d'horizon sur les plaquettes et leurs rôles dans l'hémostase et au-delà.

1. Les plaquettes circulantes, ultrastructure et caractéristiques :

Dans un contexte physiologique et en l'absence de toute lésion vasculaire, les plaquettes circulent sous forme discoïde dans un état de quiescence, dit « de repos », qui les empêche de s'agréger et de former spontanément des thrombi dans un système vasculaire autrement sain. L'état de repos est notamment maintenu par l'endothélium vasculaire, qui synthétise et sécrète à l'état basal des molécules anti-thrombotiques comme le monoxyde d'azote ou encore la prostaglandine I₂ (Mitchell et al., 2008). Dans cette partie, nous aborderons l'ultrastructure et les caractéristiques principales des plaquettes au repos (**Figure 14**), qui présentent i) une surface membranaire comprenant divers récepteurs d'adhérence et d'activation ; ii) un cytosquelette garantissant leur morphologie **lenticulaire** et l'intégrité cellulaire ; iii) des granules remplis de molécules pro-thrombotiques et ; iv) des mitochondries et réserves de glycogènes.

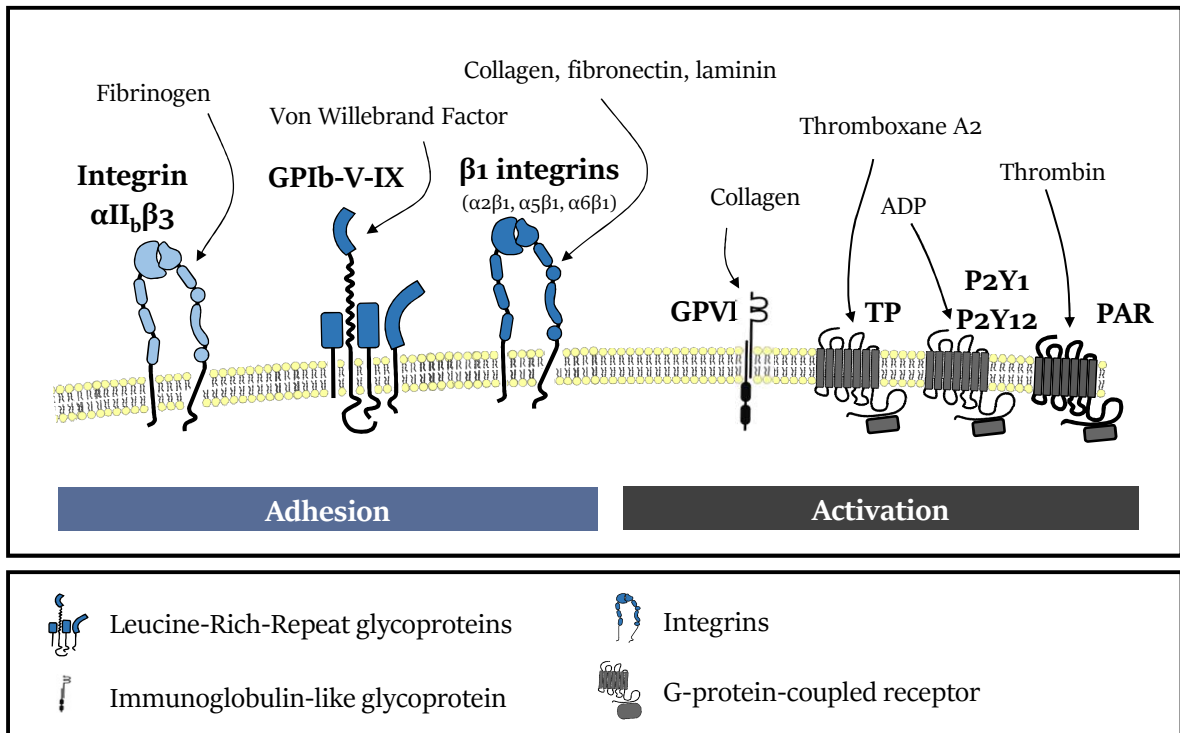


Figure 15 : Les principaux récepteurs d'adhérence et d'activation des plaquettes ainsi que leurs ligands. Représentations schématiques des récepteurs et de la membrane réalisées par Fabien Pertuy.

a. La membrane plasmique :

Récepteurs membranaires. La membrane plasmique des plaquettes recense de nombreux récepteurs essentiels à leurs fonctions hémostatiques. L'objectif ici n'est pas d'établir le profil détaillé de chacun d'entre eux, mais plutôt d'illustrer la diversité biochimique de cette interface lipidique et de son importance dans la biologie plaquettaire. Nous nous restreindrons ainsi aux récepteurs clés de l'hémostase (**Figure 15**), que nous présenterons brièvement et dont les rôles seront discutés plus tard. L'un des plus abondants est un récepteur d'adhérence liant le fibrinogène et assurant l'agrégation plaquettaire, l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (GPIIb-IIIa ou CD41-CD61, 135 et 110 kDa) avec environ 40000 à 80000 sites par plaquette ([Wagner et al., 1996](#)). Un deuxième récepteur d'adhérence très présent à la surface plaquettaire est le complexe glycoprotéique GPIb-V-IX (CD42) dont le ligand est le Facteur Willebrand, une protéine clé dans l'hémostase. Il compte environ 25000 copies par plaquette ([Modderman et al., 1992](#)) et est constitué de quatre glycoprotéines riches en leucine à savoir : GPIba (CD42b, 135 kDa), GPIb β (CD42c, 26 kDa), GPV (CD42d, 82 kDa) et GPIX (CD42a, 20 kDa) avec une stœchiométrie de 1:2:1:1 ([Li, 2019](#)). Plusieurs récepteurs d'adhérence peuvent encore être recensés sur les plaquettes, avec les intégrines $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_5\beta_1$ qui lient préférentiellement la laminine, le collagène et la fibronectine, respectivement. Enfin, la surface plaquettaire est recouverte de nombreux récepteurs d'activation plaquettaire tels que la glycoprotéine VI, un membre de la superfamille des immunoglobulines, ou encore les récepteurs couplés aux protéines G comme P2Y1 et P2Y12, qui lient l'ADP ; PAR, activés par la thrombine ; ou le récepteur au thromboxane A2. Ils sont présents dans des proportions moindres que les récepteurs d'adhérence (10 à 100 fois moins), mais restent toutefois très importants pour l'hémostase, comme nous le verrons plus tard.

Système de membrane interne. La membrane plasmique des plaquettes sanguines partage une caractéristique commune avec les mégacaryocytes, à savoir un système de membranes invaginées appelé système canaliculaire ouvert (**Figure 14**). Il est, comme son nom l'indique, ouvert sur l'extérieur et permettrait ainsi d'augmenter la surface d'échange avec celui-ci, facilitant notamment le prélèvement de protéines plasmatiques comme le fibrinogène ([Selvadurai and Hamilton, 2018](#)). Il faciliterait également l'exocytose du contenu des granules α et δ dans le milieu extérieur, et constituerait en plus une réserve de membrane permettant aux plaquettes de recouvrir une plus grande

surface une fois activées. De manière intéressante, le système canaliculaire ouvert n'est pas retrouvé dans les plaquettes de toutes les espèces de mammifères, comme les équidés ou encore les bovins chez qui il est absent (Selvadurai and Hamilton, 2018). Leurs plaquettes assurent pourtant l'hémostase, questionnant l'importance de ce réseau dans la biologie plaquettaire chez l'Homme ou la souris.

b. Le cytosquelette :

Dans la circulation, les plaquettes au repos présentent une morphologie particulière caractérisée par une forme lenticulaire, qui est soutenue par un anneau de microtubule sous-membranaire, la bande marginale et sur laquelle nous reviendrons plus tard (**Figure 14**) (White and Rao, 1998). Bien que nous nous limiterons à l'étude des microtubules dans ce travail, il faut savoir que les plaquettes sont aussi très riches en microfilaments d'actine. L'actine représente en effet 20% des protéines totale d'une plaquette, chez qui la moitié environ est sous forme polymérisée (Thomas, 2019). Dans les plaquettes, l'actine est retrouvée partout dans le cytoplasme. Toutefois, une fraction se localise préférentiellement dans l'espace cortical sous-membranaire, côtoyant les microtubules. L'actine y est maintenue à la membrane par l'intermédiaire i) de la Filamine A, une protéine liant le domaine intracellulaire de la glycoprotéine GPIIb/IIIa membranaire (Falet, 2017) et ; ii) des fibres de spectrine, qui sont directement ancrées à la membrane par le biais des phospholipides anioniques de son feuillet interne (Bogusławska et al., 2014). Le réseau sous-membranaire d'actine-spectrine constitue ainsi une enveloppe, une sorte de squelette plaquettaire dont le rôle est d'assurer l'intégrité de la cellule dans la circulation. En effet, limiter l'ancrage de l'actine à la membrane en inactivant la Filamine A ou bloquant son domaine de liaison à l'actine, provoque une microvésiculation des plaquettes sous l'action du flux qui conduit à leur destruction et se traduit par une clairance accélérée chez la souris (Cranmer et al., 2011; Jurak Begonja et al., 2011). Lors du processus d'hémostase, ce squelette sera toutefois remodelé. En particulier, l'actine dépolymérise puis se réorganise. Elle génère au passage des forces contractiles contrôlées par la myosine MYH9 qui provoquent i) un changement morphologique profond des plaquettes qui deviennent alors sphériques (Léon et al., 2007) et ii) leur contraction (réduction du volume), participant à l'exocytose des granules et à la stabilisation du thrombus (Flaumenhaft et al., 2005; Johnson et al., 2007). En parallèle, l'actine orchestre enfin l'étalement des premières couches de plaquettes sur le lieu de la brèche vasculaire via le complexe nucléateur

	α granules	δ granules
Diameter	200-500 nm	150 nm
Number	50-80 per human platelet	3-8 per human platelet
% of cell volume	10 %	1 %
Contents	<u>Integral membrane proteins :</u> <i>P-selectin...</i> <u>(Anti)coagulants and fibrinolytic proteins :</u> <i>Factor V, IX, plasminogen...</i> <u>Adhesion proteins :</u> <i>Fibrinogen, von Willebrand Factor...</i> <u>Chemokines :</u> <i>CXCL4, CXCL12...</i> <u>Growth factors :</u> <i>EGF, IGF...</i> <u>Angiogenic factors/inhibitors :</u> <i>VEGF, PDGF...</i> <u>Immune mediators :</u> <i>IgG, complement precursors...</i>	<u>Cations :</u> <i>Ca²⁺, Mg²⁺</i> <u>Polyphosphates</u> <u>Bioactive amines :</u> <i>Serotonin...</i> <u>Nucleotides :</u> <i>ADP, ATP</i>

Tableau 1: Les granules plaquettaires. Leur diamètre, nombre, pourcentage du volume occupé dans la plaquette ainsi que leur contenu sont indiqués. Adapté de Fitch-Tewfik and Flaumenhaft, 2013.

Arp2/3 (Li et al., 2002), leur permettant ainsi de limiter au mieux les pertes sanguines. Enfin, pour ce qui est des filaments intermédiaires, troisièmes et dernier type de fibres du cytosquelette, ceux-ci ont été détectés mais leur composition et rôles ne sont aujourd'hui pas connus (Tablin and Taube, 1987).

c. Les granules plaquettaires :

Dans les plaquettes, les granules α sont les plus abondants avec environ 50 à 80 par cellule chez l'Homme (moitié moins chez la souris) (Sharda and Flaumenhaft, 2018). Ils contiennent plus de 200 protéines différentes, impliquées dans l'hémostase à l'image du Facteur Willebrand et du fibrinogène, ou encore dans l'angiogenèse avec le VEGF (Tableau 1) (Maynard et al., 2007). Les granules α font environ 200 à 500 nm de diamètre et sont remarquables par microscopie électronique à transmission par un marquage hétérogène dense aux électrons (Figure 14). Pour ce qui est des granules δ , ceux-ci sont plus petits et moins nombreux avec un diamètre d'environ 150 nm (Sharda and Flaumenhaft, 2018). Ils renferment essentiellement des molécules solubles, comme la sérotonine (65 mM), de l'ATP (0.4 mM), de l'ADP (0.6 mM) ou encore du calcium en très grande quantité (2 M) (Holmsen and Weiss, 1979). Le calcium donne d'ailleurs aux granules δ une apparence unique par microscopie électronique à transmission, qui se caractérise par un dépôt très dense aux électrons entouré de matériel translucide (Figure 14). Ensemble, le contenu des granules α et δ sera relargué par les plaquettes lors d'une forte activation et sera essentiel pour assurer l'hémostase. Les déficits quantitatifs ou qualitatifs en granules plaquettaires (storage pool diseases) se manifestent ainsi par des tendances hémorragiques plus ou moins sévères, comme dans le cas du syndrome des plaquettes grises ou d'Hermansky-Pudlak (Dupuis et al., 2020; Nurden and Nurden, 2007).

d. Les mitochondries et réserves de glycogène :

Pour assurer leurs fonctions tout au long de leur vie (8-10 jours chez l'Homme, 4-5 jours chez la souris), les plaquettes embarquent un métabolisme énergétique très actif avec 5 à 8 mitochondries chez l'Homme ainsi que des réserves de glucose, stockées sous forme de grains de glycogène. Il est

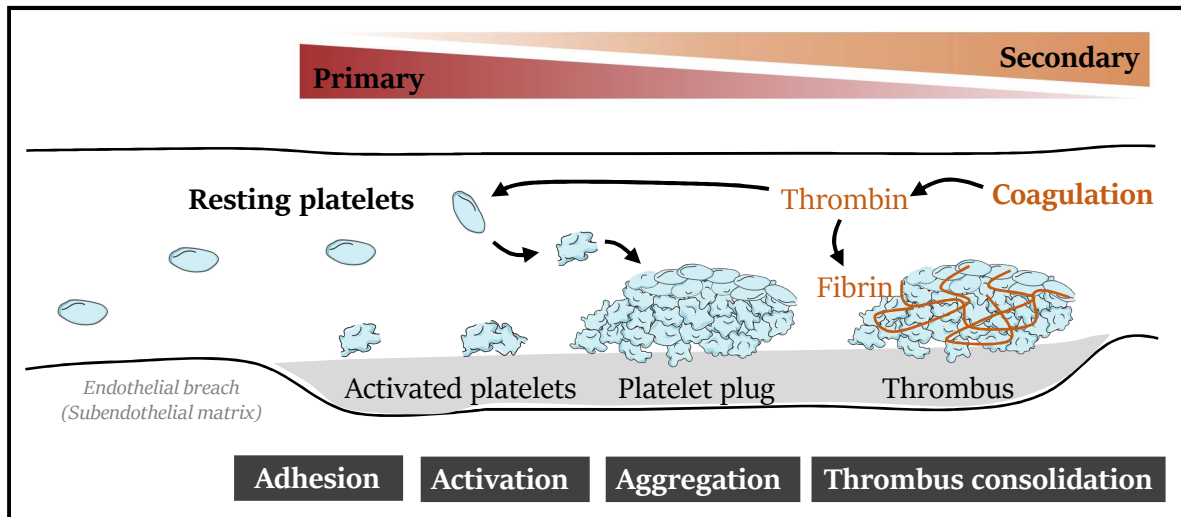
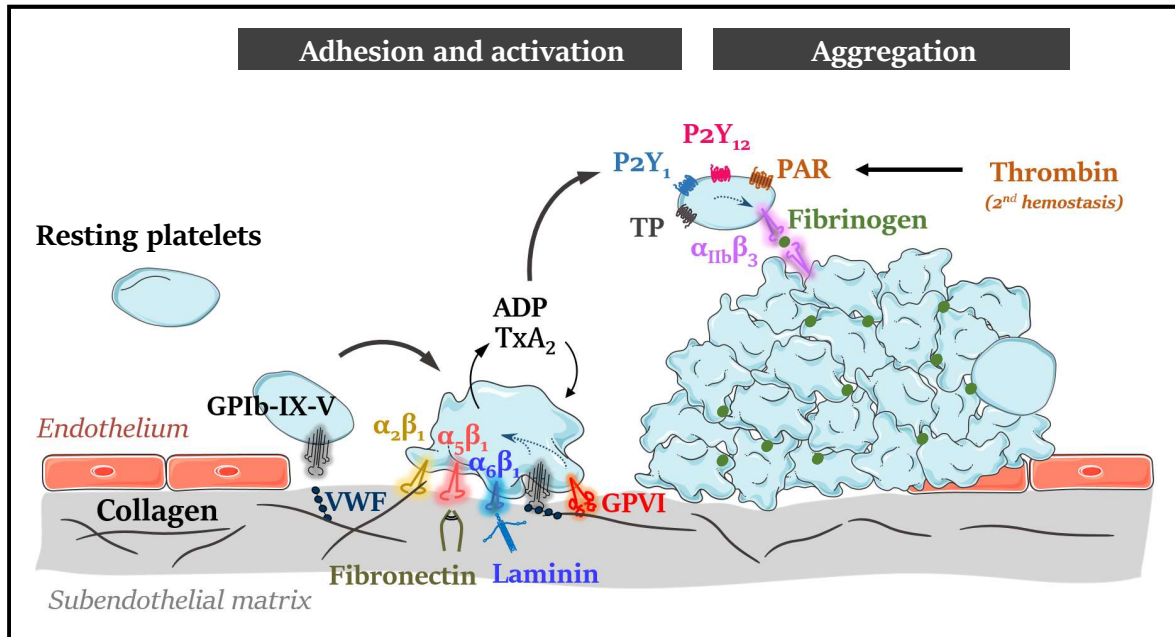


Figure 16 : L'hémostase. L'hémostase désigne l'ensemble des processus concourant à l'arrêt des saignements, et se sépare en trois volets concomitants et interdépendants : une phase de vasoconstriction (non représentée), l'hémostase primaire et l'hémostase secondaire. En cas de lésion vasculaire, le vaisseau lésé se contracte afin de ralentir le flux sanguin. Il limite de cette manière la perte sanguine, et permet la formation du thrombus. L'hémostase primaire, qui se déclenche également, fait appel aux plaquettes sanguines. Elles s'adhéreront au sous-endothélium désormais exposé, puis s'activeront et s'aggrègeront entre elles pour former un clou plaquettaire instable, le thrombus primaire. Le clou plaquettaire instable sera consolidé par l'hémostase secondaire, qui se met parallèlement en place et qui consiste en une cascade de réactions enzymatiques aussi appelée cascade de coagulation. La coagulation aboutira à la génération de thrombine dont la finalité est d'assurer la formation de fibrine, qui recouvrira et stabilisera le thrombus. Le saignement est ainsi stoppé, et la réparation tissulaire prend place. Le thrombus finira par être dissout à l'issue de la fibrinolyse (non représenté).

estimé qu'environ 60% de la génération d'ATP est réalisée par glycolyse, les 40% restant étant produits par la phosphorylation oxydative des mitochondries plaquettaires (Zharikov and Shiva, 2013). Inactiver les transporteurs glucose GLUT1 et GLUT3 chez la souris réduit drastiquement le métabolisme du glucose des plaquettes et se traduit par des défauts fonctionnels et une tendance hémorragique (Fidler et al., 2017). Les mécanismes en cause restent inconnus. En plus de leurs rôles dans la production énergétique, les mitochondries seraient quant à elles impliquées dans la survie des plaquettes, en déclenchant notamment l'apoptose caspase-dépendante en réponse au signal pro-apoptotique du facteur BAK (Mason et al., 2007). Par ailleurs, elles participeraient également dans l'activation plaquettaire, l'hémostase et la thrombose, en générant des espèces réactives de l'oxygène prothrombotiques (Caccese et al., 2000; Gutmann et al., 2020) et en favorisant l'état procoagulant des plaquettes, qui sera abordé plus tard.

2. Les plaquettes activées, rôle dans l'hémostase :

L'hémostase se définit comme l'ensemble des processus qui concourent à l'arrêt et à la prévention des saignements. En réponse à une brèche vasculaire, l'hémostase se met ainsi rapidement en place. Elle s'organise en trois volets concomitants et interdépendants qu'il est important de distinguer, à savoir une phase de vasoconstriction, l'hémostase primaire et l'hémostase secondaire (Gale, 2011) (**Figure 16**). La vasoconstriction implique des facteurs protéiques relargués par les cellules vasculaires, et permet de ralentir le flux sanguin à l'endroit lésé pour limiter les pertes sanguines et permettre la formation de thrombi. L'hémostase primaire repose de son côté en majorité sur des composants cellulaires, avec notamment les plaquettes. Elle inclut des processus d'adhérence, d'activation et d'agrégation de ces cellules au site endothélial lésé qui conduisent à la formation d'un thrombus primaire appelé clou plaquettaire. Tel que, le thrombus primaire est cependant instable. Il nécessitera d'être consolidé par l'hémostase secondaire, aussi appelée coagulation, qui repose quant à elle sur des facteurs solubles essentiellement plasmatiques. Elle aboutit à la génération de thrombine, une sérine protéase qui i) activera davantage les plaquettes et ; ii) permettra la formation de fibrine insoluble à partir du fibrinogène plasmatique, qui stabilisera le clou plaquettaire en véritable thrombus. L'hémostase primaire et secondaire sont ainsi complémentaires ; le thrombus, une fois stabilisé, stimulera la réparation tissulaire avant d'être dissout par le processus de fibrinolyse. En dehors du



<u>Adhesion receptors</u>	<u>Adhesion substrate</u>	<u>Activation receptors</u>
GPIb-IX-V	Von Willebrand Factor	GPVI
$\alpha_2\beta_1$	Collagen	TP: TxA ₂ receptor
$\alpha_5\beta_1$	Fibronectin	P2Y ₁ /Y ₁₂ : ADP receptors
$\alpha_6\beta_1$	Laminin	PAR : Thrombin receptors
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibrinogen	

Figure 17 : L'hémostase primaire. Après une lésion vasculaire, la matrice sous-endothéliale est exposée. Elle est notamment constituée de collagène (qui permet la capture du facteur Willebrand plasmatique), de fibronectine ou encore de laminine. Dans un premier temps, les plaquettes circulantes adhèrent au sous-endothélium de manière transitoire via le complexe glycoprotéique GPIb-V-IX qui lie le facteur Willebrand capturé par la matrice. Les plaquettes s'activent alors (notamment via la glycoprotéine GPVI) puis adhèrent de manière stable par l'intermédiaire des intégrines $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_6\beta_1$, qui lient le collagène, la fibronectine et la laminine, respectivement. Les plaquettes activées s'agrègent enfin par le biais de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, qui permet d'établir des ponts de fibrinogène entre elles et ainsi former un thrombus primaire, le clou plaquettaire. Il est à noter que les plaquettes activées génèrent en parallèle du thromboxane A₂ et sécrètent le contenu de leurs granules, dont de l'ADP. De concert avec la thrombine générée via l'hémostase secondaire, ces médiateurs solubles de l'agrégation plaquettaire amplifieront le processus d'hémostase primaire. Figure réalisée par Pierre Mangin (EFS Grand-Est, UMR_S1255). Abréviations: TxA₂, Thromboxane A₂.

contexte physiologique, plusieurs pathologies peuvent affecter l'hémostase. Lorsqu'elle n'est plus suffisante, comme dans le cas de mutations dans des gènes plaquettaires clés, les individus présentent alors une maladie hémorragique. Par opposition, si l'hémostase se déclenche de manière excessive, comme dans le cas d'une rupture de plaque d'athérome par exemple, elle devient pathologique et prend le nom de thrombose. Les plaquettes s'activent et forment un thrombus qui peut i) occlure le vaisseau, causant par exemple un infarctus du myocarde dans le cas des artères coronaires ; ou ii) se propager et provoquer une embolie pulmonaire ou un accident vasculaire cérébral. Dans cette partie, nous traiterons séquentiellement de l'hémostase primaire et secondaire.

a. L'hémostase primaire :

Premiers contacts avec la brèche endothéliale. En cas de brèche vasculaire dans un contexte physiologique, la matrice sous-endothéliale est alors exposée au fluide sanguin. Elle est composée de protéines adhésives pro-thrombotiques comme la fibronectine ou le collagène, qui permet quant à lui la capture d'une protéine plasmatique multimérique de haut poids moléculaire appelée Facteur Willebrand (Bonnefoy et al., 2006; Cruz et al., 1995). Le facteur Willebrand ainsi capturé permettra, sous l'action du flux, l'adhérence initiale des plaquettes au site lésé par le biais du récepteur GPIb-V-IX (Figure 17). Il est à noter que l'interaction du complexe GPIb-V-IX avec le Facteur Willebrand est transitoire, si bien qu'il ne permet pas l'adhérence stable des plaquettes (Li, 2019). La petite taille et la forme discoïde des plaquettes faciliteraient toutefois cette interaction par le biais de deux phénomènes, à savoir i) leur margination par les globules rouges, qui naviguent dans la zone centrale du vaisseau et qui poussent les plaquettes vers les parois vasculaires (Chang et al., 2018) et ; ii) leur forme d'assiette si caractéristique, dont les contours aplatis offriraient une meilleure surface de contact avec la matrice (ou les premières couches de plaquettes) par rapport à une simple sphère, forme typique d'une cellule (Mody et al., 2005). Pour adhérer fermement à la matrice (et par la suite, pour agréger), les plaquettes nécessitent l'intervention de récepteurs d'adhérence de type intégrine. Nous noterons que les intégrines sont, à l'état basal, dans une conformation de faible affinité pour leurs ligands (Ye et al., 2011). Elles subiront toutefois un changement conformationnel suite au processus d'activation plaquettaire, qui augmentera drastiquement leur affinité pour leurs ligands respectifs.

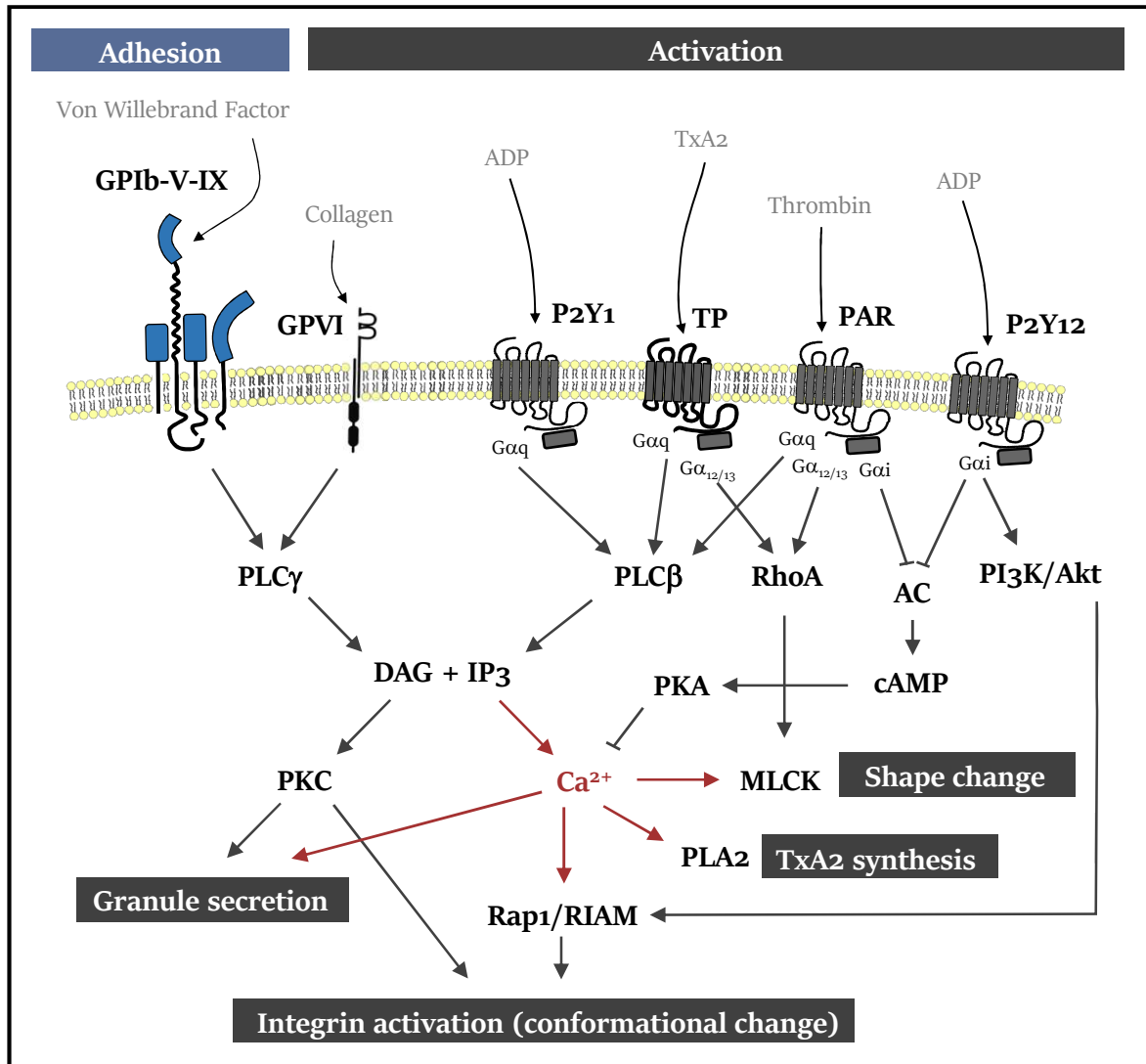


Figure 18 : La signalisation plaquettaire. Dès qu'elles s'activent, les plaquettes mettent en place une signalisation complexe à partir de ses récepteurs d'adhérence et d'activation. Elle aboutit à une augmentation intracellulaire de calcium (qui passe de 100 nM à 150-2000 nM), provenant de réserves intracellulaires ainsi que du milieu extérieur. L'augmentation calcique conduira au changement morphologique des plaquettes, à la synthèse de thromboxane A2 (TxA2), au changement conformationnel des intégrines (signalisation inside-out) ainsi qu'à l'exocytose des granules. En parallèle, l'activité de l'adénylyle cyclase (AC) plaquettaire sera inhibée, entraînant une baisse drastique du niveau intracellulaire d'AMP cyclique (AMPC), l'un des principaux signaux inhibiteurs de l'activation plaquettaire. Il est à noter qu'une fois activées et liées à leur ligands respectifs, les intégrines vont également signaler (outside-in) pour amplifier le processus d'activation plaquettaire, en stimulant la Phospholipase C γ (PLC γ), RhoA ou encore la voie PI3K/Akt. Représentations schématiques des récepteurs et de la membrane réalisées par Fabien Pertuy. Abréviations: PLC γ , PhosphoLipase C γ ; PLC β , PhosphoLipase C β ; DAG, DiAcyl-Glycerol; IP3, Inositol Trisphosphate; AC, Adénylyle Cyclase; PKC, Protein Kinase C; MLCK, Myosin Light Chain Kinase; PLA2, PhosphoLipase A2; RIAM, Rap1-GTP-Interacting Adaptor Molecule.

Activation plaquettaire, adhérence stable et agrégation. L'activation plaquettaire est initiée par l'action coordonnée du complexe GPIb-V-IX, des intégrines et de la glycoprotéine GPVI, un puissant récepteur d'activation liant le collagène de la matrice sous-endothéliale (**Figure 17**). Le processus conduira, au terme d'une signalisation très complexe que nous n'aborderons pas dans le détail, à l'activation de plusieurs intégrines assurant l'adhérence et l'agrégation plaquettaire. En particulier, il permettra d'une part l'activation des intégrines $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ qui assureront ensemble l'ancrage définitif des plaquettes au sous-endothélium par l'intermédiaire de la laminine, du collagène et de la fibronectine, respectivement. Il permettra d'autre part l'activation de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$, qui assurera de son côté l'agrégation des plaquettes par le biais de ponts de fibrinogène ([Nieswandt et al., 2009](#)). En plus d'effets conformationnels sur les intégrines, l'activation plaquettaire est accompagnée de deux événements concomitants, à savoir i) un changement morphologique et une mobilisation du cytosquelette d'actomyosine, qui aboutissent à la centralisation et à l'exocytose du contenu des granules α et δ ([Golebiewska and Poole, 2015](#)) ; et ii) la génération de thromboxane A₂ (TxA₂) qui, avec l'ADP relargué par les granules et la thrombine formée à l'issue de l'hémostase secondaire, renforceront davantage l'activation plaquettaire ([Li et al., 2010](#)). En effet, outre leurs actions autocrines, les médiateurs solubles de l'activation plaquettaire (thromboxane A₂, ADP, thrombine) amplifieront le processus à l'échelle locale de manière paracrine pour activer et recruter davantage de plaquettes au site vasculaire lésé. Il en résulte un thrombus primitif appelé clou plaquettaire, qui sera finalement consolidé par l'hémostase secondaire.

Signalisation plaquettaire. Pour assurer le processus d'activation plaquettaire, une signalisation complexe se met en place dès les premières interactions des plaquettes avec la matrice sous-endothéliale exposée (**Figure 18**). Le but ici n'est pas d'en donner tous les détails, mais plutôt d'en présenter les principaux acteurs. La majorité des agents pro-thrombotiques, aussi appelés agonistes, permettront notamment l'activation des différentes isoformes de phospholipase C exprimées dans les plaquettes. L'isoforme activée variera cependant selon l'agoniste : le collagène activera la phospholipase C $\gamma 2$ alors que l'ADP, le thromboxane A₂ ou encore la thrombine activeront la phospholipase C β ([Stalker et al., 2012](#)). Les phospholipases C permettront ensuite la génération, à partir des

INTRODUCTION

phospholipides membranaires, de diacyl-glycérol et d'inositol trisphosphate. Ils conduiront ensemble à une forte augmentation de la concentration intracellulaire d'ions calciques, mobilisés des réserves intracellulaires ou prélevés du milieu extérieur par l'intermédiaire de canaux spécialisés (Varga-Szabo et al., 2009). La concentration calcique intraplaquettaire passe ainsi d'une dizaine de nM au repos pour atteindre une fourchette de 150-2000 nM selon l'agoniste après activation (Aliotta et al., 2020). De tels mouvements calciques seront ensuite essentiels pour i) l'activation des intégrines (signalisation inside-out) par la voie CalDAG-GEFI/Rap1/RIAM (Shattil et al., 2010) ; ii) la synthèse de thromboxane A₂ (Smyth, 2010) ; iii) le changement morphologique des plaquettes en activant le cytosquelette d'actomyosine (de concert avec la voie RhoA) (Getz et al., 2010) et ; iv) l'exocytose du contenu des granules plaquettaires (de concert notamment avec la voie de la Protein Kinase C) (Stalker et al., 2012). Il est important de noter qu'une fois activées et leur ligands liés, les intégrines sont aussi capables de signaler (signalisation outside-in), stimulant par conséquent davantage l'activation plaquettaire (par le biais de la voie RhoA ou PI3K). L'ensemble des protéines présentées ici est essentielle à la formation des thrombi. L'inactivation chez la souris des petites protéines G α_q ou G $_{12}$ (Emeis et al., 2007), de la phospholipase C γ_2 (Mangin et al., 2003) ou encore de la protéine Rap1 (Stefanini and Bergmeier, 2016) entraîne ainsi une nette diminution de la réponse plaquettaire et une forte tendance hémorragique. De la même manière, des mutations chez l'Homme peuvent également être responsables d'un risque augmenté de saignement (Canault et al., 2014; Van Geet et al., 2009).

La vision présentée ici de l'hémostase primaire est simplifiée au regard de l'extrême complexité du processus. Par exemple, pour que le facteur Willebrand capturé à la matrice sous-endothéliale puisse être reconnu par le complexe GPIb-V-IX, il doit au préalable être exposé au flux sanguin. En particulier, le flux tire sur le Facteur Willebrand immobilisé, conduisant à un changement conformationnel qui découvre le domaine A₁ de liaison au récepteur GPIb-V-IX (Arce et al., 2021). Le rôle de cette interaction sera particulièrement important à des taux de cisaillement élevés, retrouvés notamment dans les artérioles (Gogia and Neelamegham, 2015; Panteleev et al., 2021). Un deuxième exemple se rapporte à la provenance du facteur Willebrand. Il est synthétisé par les mégacaryocytes ainsi que les cellules endothéliales, qui le stockent respectivement dans leurs granules α et corps de Weibel-

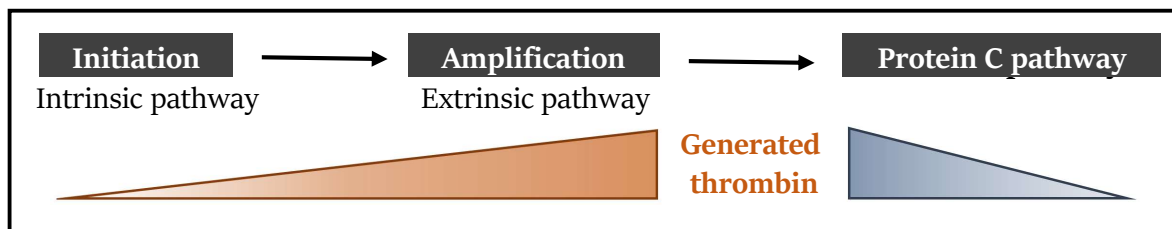
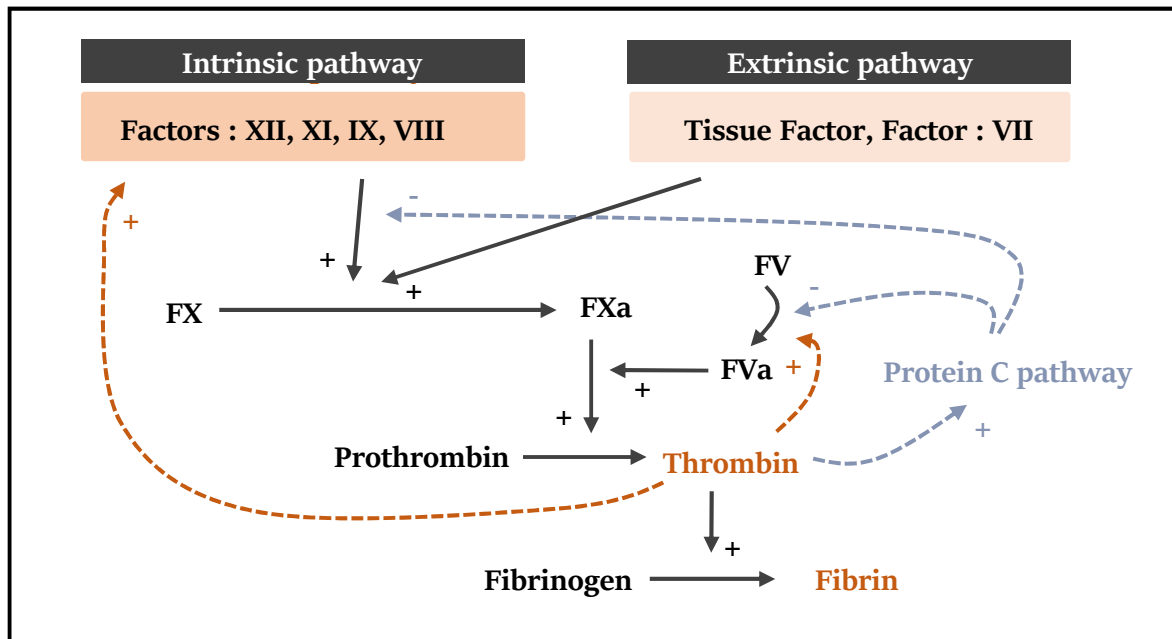


Figure 19 : L'hémostase secondaire, cascade de coagulation. En cas de lésion vasculaire, les cellules endothéliales vont aller exposer à leur surface du facteur tissulaire (voie extrinsèque), qui permet la génération d'une petite quantité de thrombine (initiation). La thrombine ainsi générée stimulera la voie intrinsèque de la coagulation, conduisant à une amplification massive du processus de formation de thrombine (amplification). Parallèlement, la thrombine générée assurera le clivage du fibrinogène plasmatique en fibrine. La fibrine assemblera ensuite, sous l'action du Facteur XIII (non représenté), un réseau insoluble qui stabilisera le thrombus.

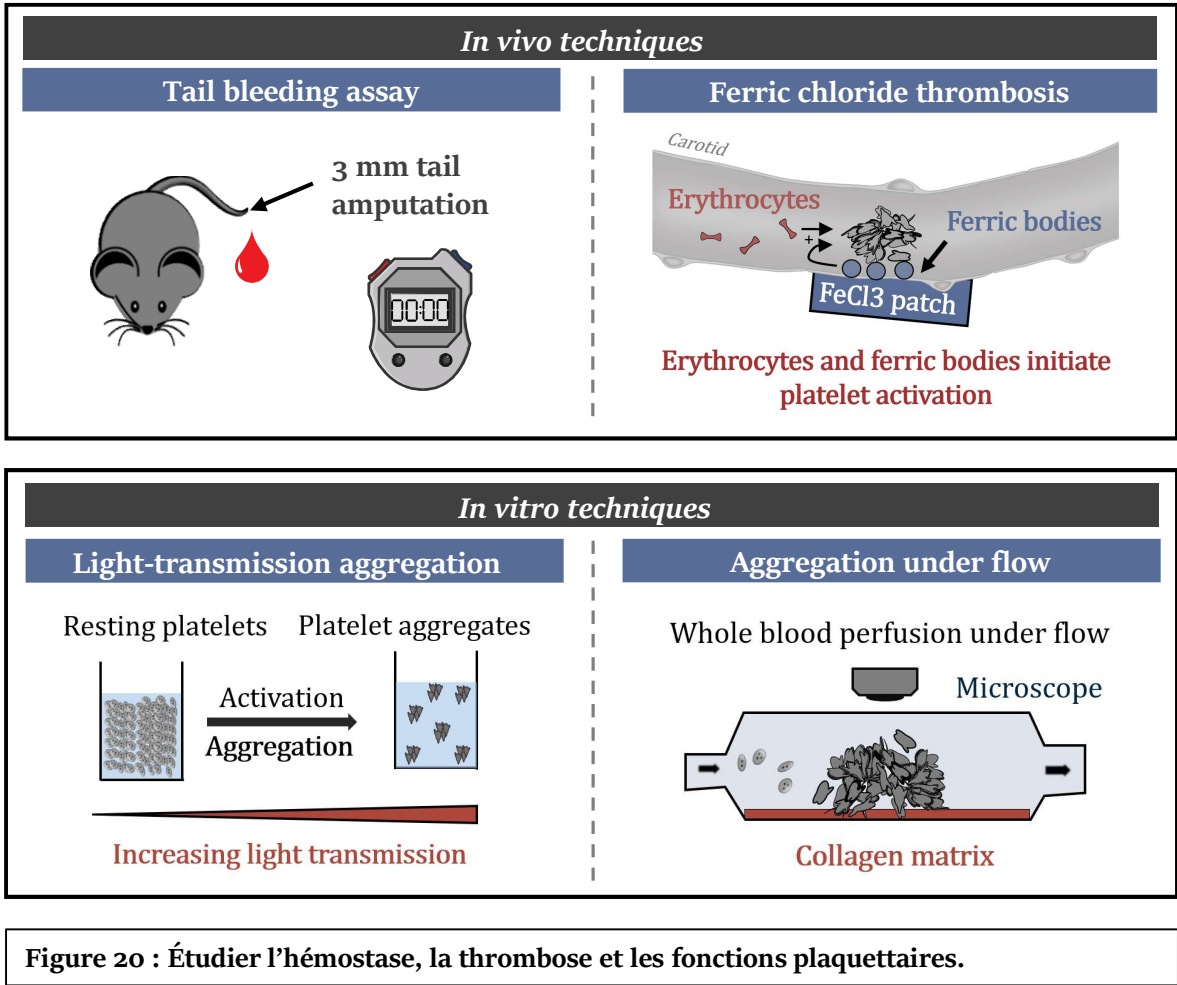
Palade jusqu'en cas de brèche vasculaire où ils sont alors sécrétés pour permettre l'hémostase primaire. Toutefois, une partie du facteur Willebrand synthétisé par l'endothélium est également relargué dans le fluide sanguin. Il y circule alors sous forme complexée avec le facteur de coagulation VIII qu'il protège de la dégradation, et qui est essentiel pour l'hémostase secondaire (Terraube et al., 2010).

b. L'hémostase secondaire :

La cascade de coagulation. L'hémostase secondaire est assurée par une cascade de réactions enzymatiques (Figure 19) réalisées par des sérines protéases plasmatiques, les facteurs de coagulation, qui sont synthétisés et sécrétés par les hépatocytes (Palta et al., 2014). Ils sont essentiels pour consolider le thrombus primaire formé par les plaquettes, si bien qu'un déficit en facteurs de coagulation provoque des maladies hémorragiques appelées hémophilies (Berntorp et al., 2021). Lors d'une blessure vasculaire, l'hémostase secondaire, ou cascade de coagulation, est initiée par l'exposition de facteur tissulaire par les cellules endothéliales de l'environnement lésé (Grover and Mackman, 2018). Elle aboutit, à terme, à la génération de thrombine suite au clivage de son zymogène plasmatique, la prothrombine. La thrombine est une enzyme polyvalente de l'hémostase. Elle constitue d'une part, un puissant activateur soluble des plaquettes favorisant ainsi l'hémostase primaire, mais est aussi, et surtout, un puissant agent procoagulant. En effet, elle permet i) d'amplifier la cascade de coagulation et la génération de thrombine en activant les facteurs V et VIII (Figure 19) ; ii) la formation d'un réseau de fibrine insoluble qui stabilisera le thrombus primaire (Crawley et al., 2007). Inhiber l'action de la thrombine par des inhibiteurs directs ou indirects comme l'hirudine ou l'héparine, respectivement, se traduit ainsi par une susceptibilité accrue au saignement (Kaiser and Markwardt, 1986). En plus d'une action positive sur l'hémostase, la thrombine exerce également une fonction anticoagulante qui lui permet de restreindre la formation de thrombus dans l'espace et le temps afin d'éviter les thromboses (Crawley et al., 2007). L'effet anticoagulant de la thrombine implique la voie de la protéine C qui assure à terme la dégradation des facteurs de coagulation Va et VIIIa. Par conséquent, l'absence de protéine C chez l'Homme augmente le risque de thrombose et d'embolisme

(Dinarvand and Moser, 2019). Dans l'ensemble la thrombine occupe donc un rôle pivot dans l'hémostase, promouvant et régulant le processus. Il en résulte un thrombus stable qui colmatera la brèche vasculaire et favorisera la réparation tissulaire avant d'être dissout par la fibrinolyse.

Lien entre hémostase primaire et secondaire. Les différentes étapes de la coagulation sont dépendantes de la présence de surface membranaires négativement chargées, qui permettent de concentrer les facteurs plasmiqes autrement solubles et d'assurer la génération de thrombine. Les plaquettes sont impliquées dans ce processus. Elles sont notamment capables de transloquer et exposer, suite à leur activation, les phosphatidylsérines (négativement chargées) du feuillet interne de leur membrane à leur surface externe, leur conférant ainsi une activité dite procoagulante (Lhermusier et al., 2011; Reddy and Rand, 2020). L'hémostase primaire et secondaire sont donc intimement liées. Les mécanismes d'exposition de phosphatidylsérines par les plaquettes activées restent cependant mal connus. Ils feraient toutefois appel aux mitochondries dont le potentiel membranaire se dépoliariserait suite à une activation plaquettaire. Elle conduirait alors à une fuite massive du calcium mitochondrial dans le cytoplasme, où la concentration deviendrait alors telle, qu'elle permettrait d'activer la scramblase calcium-dépendante TMEM16F (Millington-Burgess and Harper, 2021; Suzuki et al., 2010). L'inactivation de cette scramblase chez la souris, qui reproduit le syndrome de Scott chez l'Homme, provoque ainsi une forte réduction de la capacité des plaquettes à exposer la phosphatidylsérine et à générer de la thrombine *in vitro* (Baig et al., 2016). D'un point de vue phénotypique, le défaut se manifeste par un rallongement du temps de saignement à la queue ainsi qu'une nette diminution de la formation de thrombus dans un modèle de thrombose artérielle *in vivo*. Enfin, nous noterons que l'interaction des facteurs de coagulation avec les membranes riches en phosphatidylsérine dépend d'un cofacteur supplémentaire, le calcium plasmatique (2 mM), qui pontre les membranes plaquettaires négativement chargées avec les facteurs de coagulation, eux-mêmes négativement chargés. Par conséquent, chélater les ions bivalents sanguin à l'aide de citrate revient à anticoaguler le sang. Il est d'ailleurs régulièrement utilisé lors des prélèvements sanguins au laboratoire.



c. **Modèles d'hémostase, de thrombose et analyse des fonctions plaquettaires :**

Il existe plusieurs techniques expérimentales qui permettent d'apprécier et de caractériser les défauts d'hémostase (primaire). Nous en présenterons ici les principales, à la fois *in vitro* et *in vivo* chez la souris (**Figure 20**), qui seront utilisées dans les travaux présentés ci-après.

Modèle d'hémostase. L'une des façons la plus directe permettant d'apprécier l'hémostase est la mesure du temps de saignement. Elle est réalisée chez le rongeur par amputation distale de la queue à 3mm. De cette manière, les animaux de type sauvage ne saigneront que sur une courte période de temps car l'hémostase se met rapidement en place afin d'arrêter l'hémorragie. Par opposition à ces souris sauvages, les souris inactivées pour la glycoprotéine Ib (récapitulant le syndrome de Bernard-Soulier chez l'Homme) ou pour l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (récapitulant la Thrombasthénie de Glanzmann) montrent un fort rallongement du temps de saignement, qui peut aller jusqu'à provoquer la mort de l'animal. Des temps de saignement augmentés sont aussi retrouvés pour les souris déficientes en récepteurs à l'ADP (Foster et al., 2001; Léon et al., 1999), ou au thromboxane A₂ (Thomas et al., 1998), illustrant ainsi l'importance fonctionnelle de chaque composante de l'hémostase primaire dans la formation du clou plaquettaire. Le modèle présente toutefois des limites, notamment car le diamètre de la queue (et celui des vaisseaux qui la traversent) n'est pas toujours le même selon l'âge et le sexe de l'animal à une distance de 3 mm, introduisant ainsi une potentielle source de variabilité (Greene et al., 2010). Pour adresser ce biais, des techniques plus standardisées ont été proposées, en se basant notamment sur une incision latérale et contrôlée d'un seul vaisseau à un diamètre de queue défini (Broze et al., 2001).

Modèles de thrombose. Les modèles de thromboses consistent à créer des lésions vasculaires sans saignement afin d'initier et exacerber le processus d'hémostase, et la formation de thrombi. Ils peuvent être artériels ou veineux. Les plus utilisés dans notre cas sont les modèles de thrombose artérielle, car les thrombi formés sont très riches en plaquettes, à l'inverse des modèles veineux. D'un point de vue expérimental, la thrombose est typiquement suivie par microscopie optique, en pré-marquant les cellules par injection d'un marqueur perméable fluorescent s'incorporant dans les membranes tel que le DIOC6. L'un des modèles de thrombose artérielle parmi les plus communs est

basé sur l'application locale d'un composé chimique, le chlorure de fer, sur la carotide de l'animal. Les mécanismes permettant au chlorure de fer d'initier la thrombose restent encore mal connus. Plusieurs hypothèses ont toutefois été formulées. Le chlorure de fer pourrait initier la thrombose soit i) en abimant directement l'endothélium, passant au travers de celui-ci et formant dans la lumière du vaisseau de petites billes denses aux électrons recouvertes de facteur tissulaire ; ii) en provoquant la lyse des érythrocytes, entraînant le relargage d'hème dans la circulation qui endommage alors les cellules endothéliales et iii) ; en faisant agglutiner les plaquettes et les érythrocytes avec la paroi vasculaire (Grover and Mackman, 2020). Nous noterons que ce modèle de thrombose artérielle est très dépendant de l'action pro-thrombotique de la thrombine, si bien qu'inhiber celle-ci à l'aide d'hirudine abolit le processus (Eckly et al., 2011). En règle générale, il reste préférable de corroborer les résultats obtenus par d'autres modèles de thrombose, qui diffèrent par le type de vaisseau lésé (aorte, artère mésentérique, veine jugulaire), par la méthode de lésion (chimique, mécanique) et par conséquent, les mécanismes initiateurs mis en jeu. Il existe par exemple des modèles de thrombose à lésion mécanique par pincement de l'aorte, qui conduit à l'exposition des protéines sous-endothéliales pro-thrombotiques et qui est bien moins dépendant de l'action de la thrombine (Tang et al., 2016). Il existe enfin des modèles de thrombose disséminée (de thromboembolisme) qui consistent en l'injection d'un mélange pro-thrombotique de collagène et d'adrénaline dans la veine jugulaire. Le mélange induira l'activation et l'agrégation des plaquettes, conduisant à la formation de thrombi qui iront alors se loger dans les poumons et causer la mort de l'animal (DiMinno and Silver, 1983). Dans ce modèle, la survie des animaux est analysée.

Techniques *in vitro* pour l'analyse des fonctions plaquettaires. Lors de défauts d'hémostase, des analyses exploratoires *in vitro* peuvent être réalisées afin d'identifier un potentiel défaut d'origine plaquettaire. L'une des méthodes de choix est l'agrégation par turbidimétrie, développée dans les années 1960 par le biologiste germano-britannique Gustav Born (Born, 1962), qui permet d'évaluer la capacité d'une suspension de plaquettes (isolées par centrifugation) à agréger. Le principe de la méthode repose sur la transmission lumineuse, qui est minimale lorsque les plaquettes au repos forment une suspension homogène et maximale lorsqu'elles sont activées et agrégées. L'activation

plaquettaire est initiée par l'addition de différents agonistes, comme l'ADP, le collagène ou la thrombine. De cette manière, il est alors possible de détecter des défauts d'agrégation liés à l'absence d'un large spectre de protéines impliquées dans la fonction plaquettaire, qu'ils soient des récepteurs membranaires comme pour l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (Smyth et al., 2001; Tronik-Le Roux et al., 2000) ou P2Y₁ (Léon et al, 1999), ou des protéines intracellulaires impliquées dans la signalisation comme les petites protéines G α_q (Emeis et al., 2007). La technique d'agrégation par turbidimétrie reste toutefois incomplète, utilisant des plaquettes isolées de leur fluide sanguin et ne prenant pas en compte les conditions rhéologiques de l'environnement vasculaire. Pour intégrer ces variables, des techniques d'agrégation en flux ont été développées. La méthode consiste à perfuser du sang total anticoagulé dans une chambre microfluidique recouverte d'une matrice comme le facteur Willebrand ou le collagène, capable de promouvoir l'adhérence et/ou l'activation et l'agrégation des plaquettes, mimant ainsi les conditions d'un vaisseau lésé exposant un sous-endothélium. La perfusion est réalisée à un taux de cisaillement fixe de 500 à 3000 s⁻¹ pour des échantillons murins qui reproduisent les paramètres veineux et artériels, respectivement. Par microscopie optique, il devient alors possible de visualiser l'interaction initiale des plaquettes (matrice de Facteur Willebrand) ainsi que la formation d'agrégats plaquettaires (matrice de collagène). Dans le cas des souris déficientes pour la glycoprotéine Ib par exemple, l'adhérence sur Facteur Willebrand et la formation d'agrégats sur matrice de collagène sont fortement réduites (Strassel et al., 2007). L'observation confirme l'importance du complexe GPIb-V-IX dans l'adhérence transitoire initiale des plaquettes et la formation des agrégats. Dans le cas d'une Thrombasthénie de Glanzmann, les plaquettes sont incapables là-encore de former des agrégats (van de Vijver et al., 2012).

3. Rôles non-hémostatiques des plaquettes :

Bien que peu étudiés au regard de leurs rôles dans l'hémostase et la thrombose, les plaquettes peuvent être impliquées dans plusieurs processus non-hémostatiques. Elles auraient notamment un rôle positif dans l'immunité innée, favorisant l'élimination des bactéries du sang. Elles joueraient à l'inverse un rôle plutôt délétère dans le cancer, favorisant la dissémination métastatique.

a. Immunité innée :

En cas de sepsis, les plaquettes peuvent interagir avec les bactéries par l'intermédiaire des récepteurs Toll-Like, qui furent identifiés dans les années 1990 suite aux travaux d'une équipe strasbourgeoise dirigée par le nobélisme Jules Hoffmann (Lemaitre et al., 1996). En particulier, les plaquettes expriment à leur surface le récepteur TLR4 qui leur permet de reconnaître les lipopolysaccharides décorant les bactéries de type Gram négatif. Les plaquettes se recouvriraient ainsi de bactéries qu'elles rapporteraient alors aux cellules immunitaires, dont les neutrophiles, pour qu'ils réalisent la nérose (Yeaman, 2014). La nérose est un processus de mort cellulaire qui se caractérise par l'expulsion de matériel nucléaire dans le milieu extracellulaire afin de piéger et tuer les bactéries, empêchant ainsi leur dissémination (Clark et al., 2007; Gaertner et al., 2017). Enfin, toujours par l'intermédiaire du récepteur TLR4, les plaquettes sécrèteraient des cytokines qui seraient à leur tour capables de déclencher une réponse différentielle par les leucocytes selon l'espèce de bactérie reconnue (Berthet et al., 2012; Cognasse et al., 2008). En effet, du surnageant de plaquettes pré-exposées aux bactéries *Salmonella minnesota* provoque la sécrétion d'IL-6, IL-8 et TNF α par les leucocytes, alors qu'à l'inverse, du surnageant de plaquettes pré-exposées à *Escherichia coli* n'élucite pas cette réponse. Les mécanismes exacts gouvernant ce caractère sélectif ne sont pas connus.

b. Cancer et dissémination métastatique :

Les plaquettes expriment à leur surface plusieurs intégrines, dont $\alpha 6\beta 1$ qui serait impliquée dans la dissémination métastatique des cellules tumorales (Mammadova-Bach et al., 2016). En effet, l'inactivation de la sous-unité $\alpha 6$ dans la lignée plaquettaire chez la souris réduit le nombre de tumeurs pulmonaires dans un modèle de métastase induite par l'injection de cellules cancéreuses dans le tissu mammaire. Le mécanisme reposerait sur l'interaction de l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ plaquettaire avec l'un de ses ligands, ADAM-9, présent à la surface des cellules tumorales. ADAM-9 induirait notamment l'exocytose du contenu granulaire des plaquettes, comme l'ADP, qui favoriserait alors l'extravasation des cellules tumorales au travers des cellules endothéliales et donc le processus de métastase. Dans l'ensemble, de tels résultats pourraient permettre le développement de traitements anti-métastatique.

INTRODUCTION

L'intégrine $\alpha6\beta1$ n'étant pas impliquée dans l'hémostase, elle pourrait être un candidat dont le blocage n'entraînerait pas une augmentation du risque hémorragique. Les intégrines $\alpha6\beta1$ sont toutefois exprimées de façon ubiquitaire dans l'organisme, et plusieurs études seront nécessaires pour évaluer les potentiels effets indésirables et risques sur la santé.

Deuxième partie

Le cytosquelette de microtubule

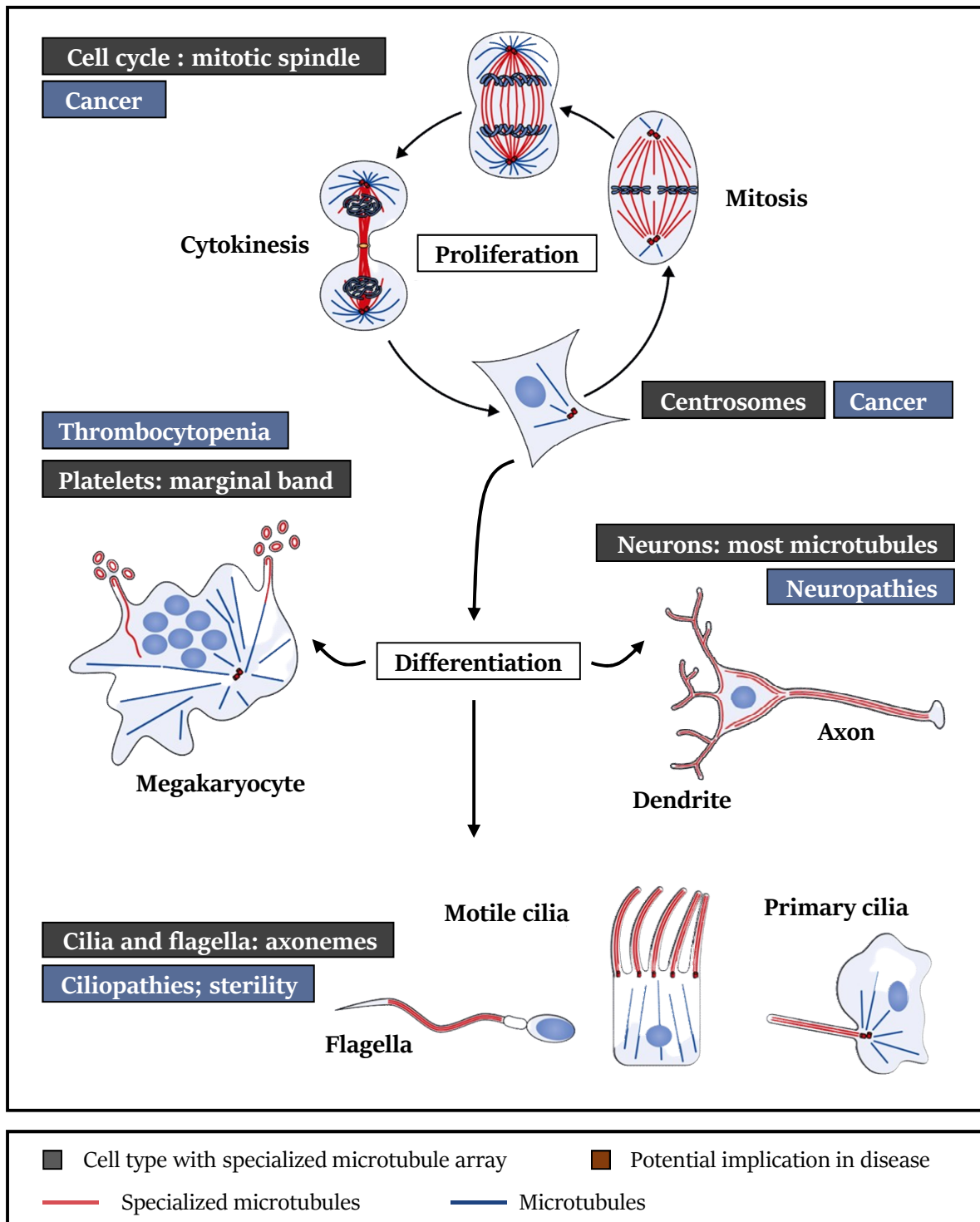
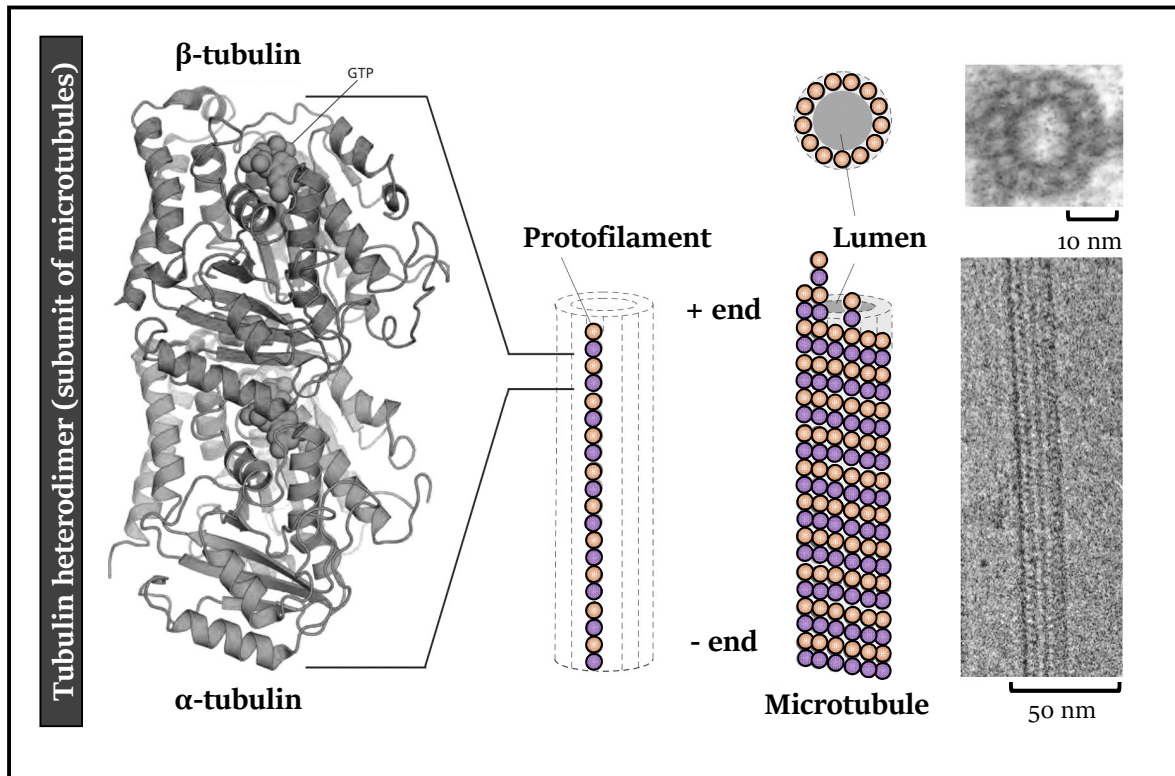


Figure 21 : Les rôles du cytosquelette de microtubule. Les microtubules assurent un très large éventail de fonctions dans la cellule par l'intermédiaire de structures spécialisées. Ils permettent ainsi la prolifération cellulaire, en assemblant le fuseau mitotique lors des phases de mitose. Dans les cellules différenciées, ils participent notamment à l'ultrastructure cellulaire comme dans les plaquettes avec la bande marginale. Ils sont également impliqués dans le transport d'organelles dans les neurones, ou encore dans l'assemblage des flagelles des spermatozoïdes. Perturber les microtubules peut par conséquent conduire à de nombreuses pathologies comme des thrombopénies, des neuropathies ou des ciliopathies. *Adapté de Gadadhar et al, 2017.*

Le cytosquelette de microtubule :

Le cytosquelette désigne un réseau de fibres intracellulaires d'origine protéique. Il orchestre l'architecture des cellules, et assure parallèlement un large éventail de processus biologiques indispensables à la vie comme la division cellulaire ou encore la motilité cellulaire (Hohmann and Dehghani, 2019; Cabeen and Jacobs-Wagner, 2010). Dans les cellules eucaryotes, le cytosquelette est formé par trois grands types de fibres, nommées selon leurs diamètres respectifs : les microfilaments d'actine ($\text{\O} 6 \text{ nm}$), les filaments intermédiaires ($\text{\O} 10 \text{ nm}$) et les microtubules ($\text{\O} 25 \text{ nm}$). Pour assurer les divers processus dans la cellule, le cytosquelette tire profit de la dynamique et des propriétés biophysiques qui caractérisent chacune des fibres. Les microfilaments d'actine sont ainsi la référence dans les processus de nature contractile, pour les cellules musculaires ou les plaquettes (Squire, 2019). Les filaments intermédiaires montrent quant à eux des propriétés viscoélastiques singulières (Sanghvi-Shah and Weber, 2017), les rendant flexibles et conférant aux cellules et aux tissus une résistance au stress mécanique (Pekny and Lane, 2007). Les microtubules, qui nous intéressent ici, sont à l'inverse plutôt rigides à l'échelle microscopique (Gittes et al., 1993). Ils établissent un échafaudage intracellulaire complexe servant à la fois au mouvement cellulaire via les flagelles; de soutien structurel avec la bande marginale des plaquettes ; mais aussi de route de transport pour acheminer du matériel génétique lors de la mitose, ou des organites cellulaires comme le long des axones dans les neurones (**Figure 21**) (Janke and Magiera, 2020).

Premières observations. Les premiers travaux évoquant les microtubules remontent à la fin du XIX^{ème} siècle, période à laquelle la notion de cytosquelette était en réalité encore inconnue. Le biologiste allemand Walther Flemming, figure pionnière ayant identifié les chromosomes, avait pourtant déjà observé (sans le savoir) des microtubules sur lesquels se déplaçait le matériel génétique lors de la mitose (Flemming, 1880). Il faudra toutefois attendre plusieurs décennies et l'essor de la microscopie électronique, pour enfin pouvoir observer les microtubules tels qu'on les connaît aujourd'hui. En particulier, c'est au début des années 1960 suite au développement de nouvelles techniques de préparation d'échantillon, qu'ils furent réellement décrits et qu'ils devinrent un domaine de recherche à part entière. L'une des innovations majeures fut l'utilisation du glutaraldéhyde en tant que




 α and β tubulin heterodimers

Figure 22 : La structure du microtubule. Les microtubules sont des tubes creux formés de milliers de briques élémentaires appelées les hétérodimères de tubuline α et β . Les hétérodimères constituent d'abord des protofilaments asymétriques, qui s'apposent latéralement et croissent de façon simultanée afin de donner naissance au polymère. Les microtubules sont par conséquent polarisés, avec d'un côté une extrémité positive (+) qui s'allonge, et de l'autre une extrémité négative (-). Dans la majorité des cas, les microtubules sont formés de 13 protofilaments. *Adapté de Molecular Biology Of The Cell, 6th edition, Figure 16-42.*

fixateur, qui offre une meilleure conservation des structures intracellulaires par rapport aux traditionnels formaldéhydes (Sabatini et al., 1963). Il permit ainsi pour la première fois à deux groupes de recherche américains (Ledbetter and Porter, 1963; Slautterback, 1963), de visualiser les microtubules des cellules végétales et animales. Et c'est d'ailleurs eux qui les baptisèrent « Microtubules », terme qui fut ensuite rapidement adopté par la communauté scientifique. Depuis, les microtubules ont été retrouvés dans toutes les cellules eucaryotes analysées, par opposition aux procaryotes chez qui ils sont absents. Dans cette partie, nous nous intéresserons à la biologie des microtubules, à ce qui régit leurs comportements, ainsi qu'à leurs fonctions dans la lignée plaquettaire.

A. Le microtubule, structure et dynamique :

Les microtubules sont des polymères très dynamiques d'environ 25 nm de diamètre. Ils prennent l'apparence de tubes creux pouvant s'étendre sur plusieurs micromètres de longueur, et dont les parois sont le plus souvent constituées de 13 protofilaments (**Figure 22**). Les protofilaments sont formés d'hétérodimères de petites protéines GTPases très conservées appartenant à la superfamille des tubulines : les tubulines α et β (Findeisen et al., 2014). Les hétérodimères de tubuline représentent ainsi les briques élémentaires des microtubules. Dans le cytoplasme, les microtubules émergent de zones discrètes appelées centres organisateurs, qui abritent un troisième membre de la superfamille des tubulines, lui aussi très conservé : la tubuline γ (Findeisen et al., 2014). Il est important de noter que la superfamille des tubulines comporte d'autres membres (les tubulines δ , ϵ et ζ) qui sont peu conservés au cours de l'évolution et dont les fonctions sont encore mal connues (Findeisen et al., 2014). Par conséquent, nous nous intéresserons ici uniquement aux hétérodimères de tubuline α et β , à leur nucléation par la tubuline γ ainsi qu'à leur dynamique d'assemblage.

1. L'hétérodimère de tubuline α et β :

a. Découverte de l'hétérodimère de tubuline α et β :

Les hétérodimères de tubuline α et β ont été découverts dans les années 1960 suite aux travaux de l'équipe américaine d'Edwin Taylor, qui s'intéressait à ce moment à la division cellulaire. L'équipe

Tubulin name	Symbols and other names	Chromosome (human)
<i>α-tubulin family</i>		
α1A-tubulin	TUBA1A	12q13.12
α1B-tubulin	TUBA1B	12q13.12
α1C-tubulin	TUBA1C	12q13.12
α3C-tubulin	TUBA3C	13q12.11
α3D-tubulin	TUBA3D	2q21.1
α3E-tubulin	TUBA3E	2q21.1
α4A-tubulin	TUBA4A	2q35
α8-tubulin	TUBA8	22q11.21
Tubulin α like 3	TUBAL3	10p15.1
<i>β-tubulin family</i>		
β1-tubulin	TUBB1, TUBB class VI	20q13.32
β2A-tubulin	TUBB2A, TUBB class II	6p25.2
β2B-tubulin	TUBB2B, TUBB class II	6p25.2
β3-tubulin	TUBB3, TUBB class III	16q24.3
β4A-tubulin	TUBB4A, TUBB class IVa	19p13.3
β4B-tubulin	TUBB4B, TUBB class IVb	9q34.3
β5-tubulin	TUBB, TUBB5, TUBB class I	6p21.33
β6-tubulin	TUBB6, TUBB class V	18p11.21
β8-tubulin	TUBB8, TUBB class VIII	10p15.3

Tableau 2: Les familles de tubuline α et β. Le nom officiel de chaque isotype, ainsi que son symbole, ses potentielles autre dénominations et la localisation du leur gène dans le génome sont répertoriés. Informations tirées du site du comité de nomenclature HUGO : <https://www.genenames.org/> (groupe tubuline 778).

tira notamment parti de la colchicine, un alcaloïde produit par le colchique. Bien que son mode d'action était à cette encore inconnu, la molécule fut rapportée pour désassembler le fuseau mitotique et bloquer la mitose (Inoué, 2008). Les premières expériences de l'équipe américaine attribuèrent à la colchicine une très forte affinité pour un ligand inconnu, mais abondant dans les extraits riches en microtubule comme ceux de fuseau mitotique (Borisly and Taylor, 1967). La colchicine fut alors suspectée pour lier spécifiquement les microtubules et leur unité de base. L'hypothèse fut rapidement confirmée à l'aide de colchicine tritiée, dont le ligand (suivi par radioactivité) rapportait un coefficient de sédimentation de 6S et un poids moléculaire de ≈ 110 kDa : des caractéristiques semblables au composant majoritaire des microtubules (inconnu à l'époque) parallèlement purifié (Borisly and Taylor, 1967; Shelanski and Taylor, 1967). L'hypochlorite de guanidine, un puissant dénaturant, sépare par ailleurs le facteur 6S en deux sous-unités de ≈ 60 kDa chacune, présentant alors un dimère comme la brique élémentaire du microtubule. Les monomères seront rebaptisés du nom de tubuline (Mohri, 1968). Des études complémentaires conduiront toutefois à préciser que le dimère était en réalité composé de deux monomères de tubulines différents (Bryan and Wilson, 1971) : les tubulines α et β . Bien qu'ils aient un poids moléculaire très proche, la migration électrophorétique des monomères de tubuline α est légèrement retardée sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes par rapport aux monomères de tubuline β .

b. Les monomères de tubuline α et β :

Les tubulines α et β sont des protéines très conservées d'environ 450 acides aminés. Elles représentent en moyenne 2 à 5% des protéines totales solubles d'une cellule (≈ 10 -20 μ M pour une lignée cellulaire), un chiffre qui peut toutefois grimper jusqu'à 25% dans le cerveau (Hiller and Weber, 1978; Van de Water and Olmsted, 1980). D'un point de vue évolutif, les tubulines α et β partagent environ 40% d'identité protéique. Elles sont le fruit d'un seul et même ancêtre commun, dupliqué au cours de l'évolution. Bien que le moment exact soit inconnu (Keeling and Doolittle, 1996), l'hypothèse est appuyée par l'existence d'un homologue procaryote, FitZ (McQuillen and Xiao, 2020). Plusieurs évènements de duplication auraient ensuite suivi, permettant aux tubulines α et β de constituer, chacune indépendamment et par effet de sous-fonctionnalisation génique, leur propre petite famille de protéines (Tableau 2) (Findeisen et al., 2014; Nielsen et al., 2010). Les membres de chaque

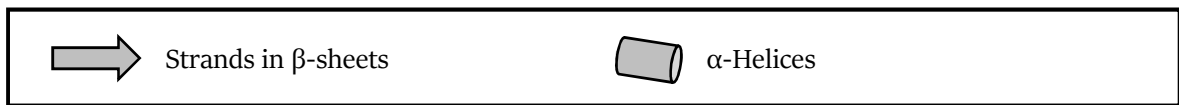
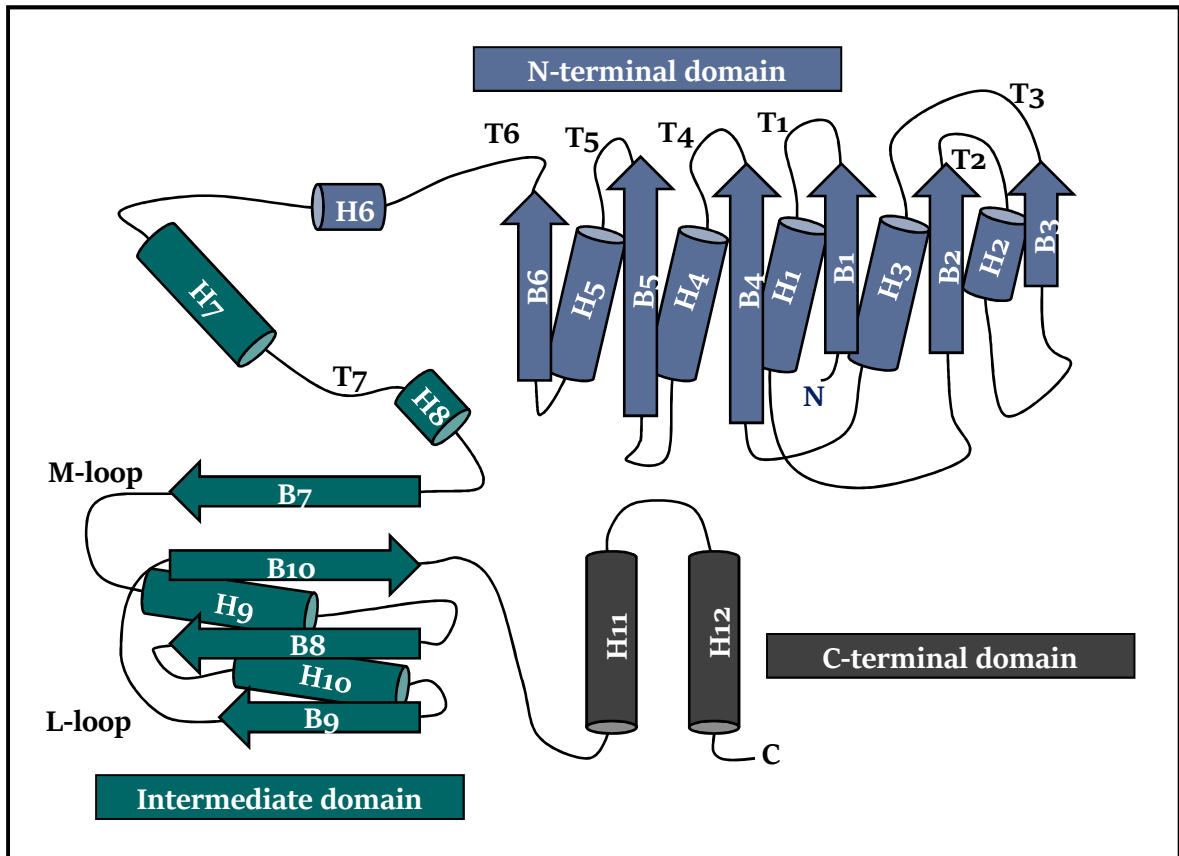


Figure 23 : Les trois grands domaines fonctionnels des tubuline α et β . Les tubulines renferment chacune deux feuillets β de 6 et 4 brins, flanqués par 12 hélices α . Le domaine N-terminal (acides aminés 1-205), intermédiaire (acides aminés 206-381) et C-terminal (acides aminés 382-450) sont représentés. Adapté de Amos, 2004.

famille, appelés isotypes, sont ainsi encodés par différents gènes éparpillés sur plusieurs chromosomes. Il est intéressant de noter que leur apparition dans l'évolution corrèle avec celle de la multicellularité, reflétant peut-être leur implication spécifique dans certaines fonctions cellulaires (Ludueña and Banerjee, 2009). En effet, les isotypes de tubuline possèdent chacun des caractéristiques uniques dont l'expression différentielle est aujourd'hui perçue comme l'une des sources de la diversité fonctionnelle des microtubules (Janke and Magiera, 2020). Nous reviendrons sur ce sujet plus tard.

c. La structure des hétérodimères de tubuline α et β :

La structure des monomères de tubuline α et β fut pour la première fois résolue à la fin des années 1990 par cryo-microscopie électronique (Nogales et al., 1998). Elle permit d'identifier trois grands domaines fonctionnels dans les tubulines (**Figure 23**). Le domaine N-terminal renferme l'activité GTPase ainsi qu'un site de liaison aux nucléotides. Pour les tubulines α , le site est appelé « N-site » pour Non échangeable. Le GTP qu'il dissimule n'est jamais hydrolysé et sert au maintien de l'intégrité de l'hétérodimère (Menéndez et al., 1998). Pour les tubulines β , le site est quant à lui appelé « E-site » pour Echangeable. Le GTP qu'il possède est cette fois-ci hydrolysable et occupe un rôle très important dans la dynamique des microtubules, sur laquelle nous reviendrons plus tard. Le domaine intermédiaire est un domaine structural qui participe également, au moins pour celui des tubulines α , à la dynamique des microtubules (Alushin et al., 2014). Enfin, le court domaine C-terminal des tubulines constitue l'interface du polymère avec le milieu cytoplasmique. Il porte plusieurs types de modifications post-traductionnelles, que nous aborderons plus tard et qui régulent l'interaction des microtubules avec des protéines effectrices.

2. La formation des hétérodimères de tubuline α et β :

a. La voie de biosynthèse des tubulines α et β :

Mécanisme. Dans la cellule, les monomères de tubuline ne se replient ni ne s'assemblent seuls en hétérodimères (Lewis et al., 1997). Ils nécessitent l'intervention d'un système élaboré de protéines

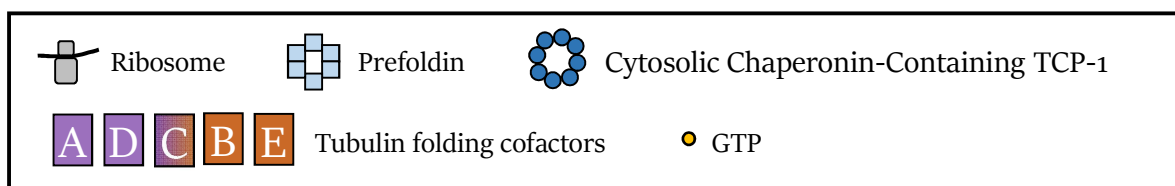
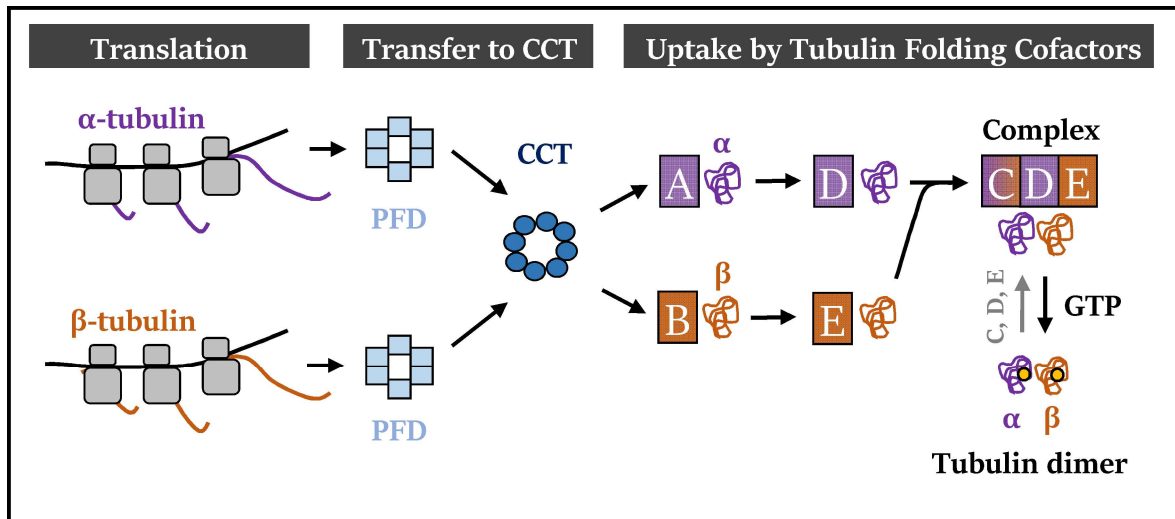


Figure 24 : La biosynthèse des tubuline α et β . Les tubulines néosynthétisées sortant des ribosomes sont récupérées par la préfoldine, qui les protège de la dégradation et les transfère ensuite au complexe CCT. Le complexe CCT, après plusieurs cycles ATP-dépendants, repliera les tubulines dans une forme quasi-native. Les tubulines ainsi formées seront enfin prises en charge par les cofacteurs de repliement des tubulines, qui assureront quant à eux leur assemblage final en hétérodimère-GTP. Adapté de Tian and Cowan, 2013.

chaperonnes, qui permettent notamment d'empêcher le mauvais repliement ou la formation d'agrégats toxiques pour la cellule (Gestaut et al., 2019; Hansen et al., 1999). Pour les tubulines, leur voie de biosynthèse est exclusive aux cellules eucaryotes. Il n'est pas possible de faire fabriquer, par le biais de vecteurs d'expression plasmidique par exemple, des tubulines chez les bactéries : elles y formeraient des corps d'inclusion insolubles (Cowan, 1998). L'incapacité des bactéries à produire les tubulines fut cependant habilement exploitée pour comprendre leur formation. En effet, les corps d'inclusion insolubles ne sont que des polypeptides de tubuline immature, non repliés. Ils peuvent être extraits, et incubés *in vitro* en présence de protéines dont on suspecte une activité de repliement pour la tubuline. En fonction de sa mobilité électrophorétique sur gel d'acrylamide en condition non-dénaturante, il est ainsi possible de déduire si la protéine d'intérêt participe au processus. La plupart des acteurs furent identifiés de cette manière (Cowan and Lewis, 2001). La biosynthèse des tubulines (Figure 24) repose sur deux protéines chaperonnes, qui ne sont d'ailleurs pas seulement dédiées au repliement des tubulines : la préfoldine, qui récupère les monomères à la sortie du ribosome (Liang et al., 2020) et le complexe Cytosolic Chaperonin-Containing TCP-1 (CCT), qui les replie dans une forme quasi finale (Tian et al., 1995). Les monomères seront ensuite pris en charge par les nombreux Tubulin Folding Cofactors (TFCs) qui sont quant à eux spécifiquement consacrés à leur assemblage final en hétérodimères (Gao et al., 1993).

Régulation de la biosynthèse. La biosynthèse des tubulines nécessite l'intervention de nombreux cofacteurs spécifiques (TFCs). Bien qu'il n'y ait pas de consensus sur les raisons de cette pluralité, il est envisageable qu'ils permettent une régulation fine du processus. Dans un premier temps, étant donné la place des TFC A et B, il est tentant de leur attribuer un rôle de « réservoir » pouvant tamponner une surproduction. L'effet est modeste, car un excès de tubuline (surtout β) est vite toxique chez la levure, entraînant une disparition des microtubules conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire (Weinstein and Solomon, 1990). Dans un deuxième temps, le système pourrait permettre de réguler, voire de recycler, la quantité de produit fini dans la cellule (Nithianantham et al., 2015). L'hypothèse est en accord avec la capacité des TFC C et E à dissocier les hétérodimères de tubuline, voire à dépolymériser les microtubules si surexprimés (Bhamidipati et al., 2000; Serna et al., 2015). Bien qu'hy-

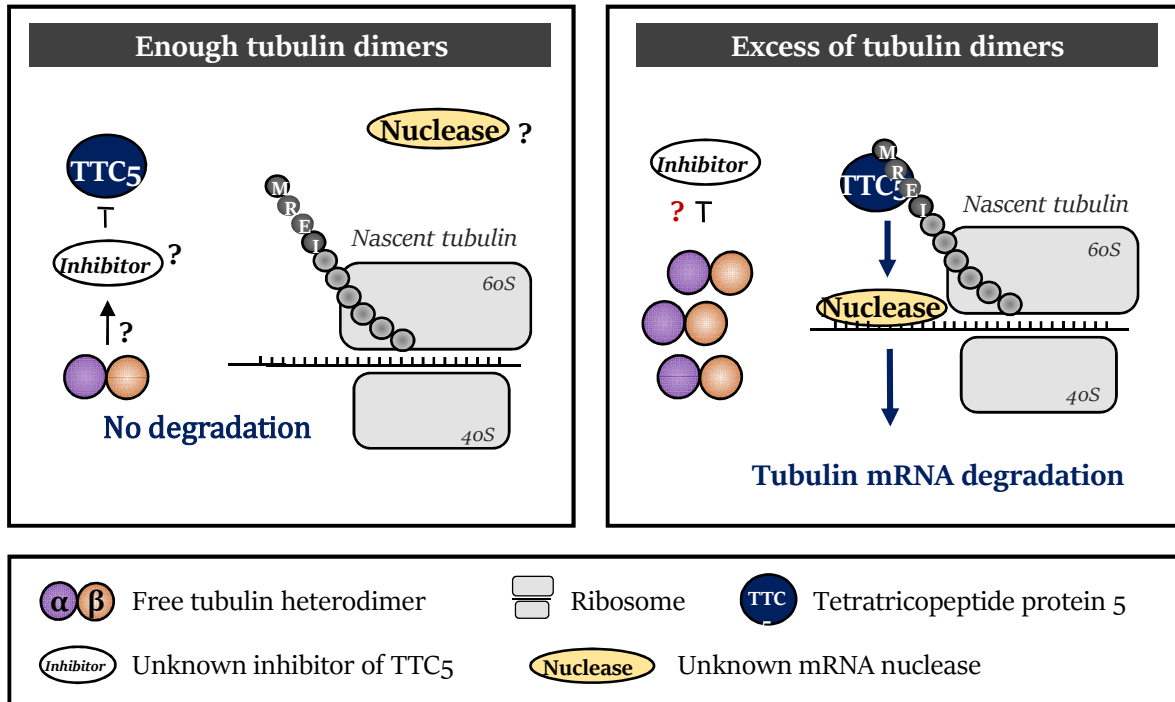


Figure 25 : L'autorégulation de la tubuline. En fonction de la quantité d'hétérodimère de tubuline libre dans la cellule, la protéine TTC5 est majoritairement inactive (gauche, lorsque la production de tubuline est équilibrée) ou dans un état activé (droite, lors d'un excès de tubuline). Dans le deuxième cas, la TTC5 se lie à la séquence N-terminale des tubulines ce qui, par l'intermédiaire d'une nucléase encore inconnue, entraîne la dégradation de l'ARN messager en cours de traduction. Le mécanisme permettra de ralentir la production de tubuline afin d'en ramener la concentration intracellulaire à des niveaux physiologiques.

pothétique, il est ainsi possible d'imaginer un système autonome permettant d'ajuster quantitativement et qualitativement les hétérodimères dans les cellules. L'idée est d'autant plus plausible avec la notion d'isotype de tubuline, dont certains pourraient être stockés par les TFCs et rapidement réarrangés en hétérodimères pour répondre à des besoins spécifiques.

b. L'autorégulation de la tubuline :

En plus de potentiels systèmes de régulation intrinsèques à la voie de biosynthèse, la cellule dispose d'un mécanisme indépendant pour réguler la production des monomères de tubuline. Il correspond à une boucle de rétrocontrôle négatif conditionnée par la quantité d'hétérodimères libres. Le mécanisme fut initialement suspecté dans les années 1980 par plusieurs groupes américains, dont celui du biologiste Don W. Cleveland. Les chercheurs avaient observé qu'un traitement à la colchicine, qui dépolymérise les microtubules et augmente ainsi la concentration d'hétérodimères libres, entraînait une diminution de la quantité d'ARNm de tubuline (Ben-Ze'ev et al., 1979; Cleveland et al., 1981). Le taxol, qui stabilise les microtubules et entraîne ainsi une diminution du nombre d'hétérodimères libres dans la cellule, provoque une réponse inverse (Pachter et al., 1987). Le système de régulation fut appelé *Autorégulation de la tubuline*, et reste encore mal décrit à ce jour (**Figure 25**). Il est toutefois co-translationnel et ferait intervenir la tetratricopeptide protein 5 (TTC5) (Gasic and Mitchison, 2019; Lin et al., 2020). Dans les cellules, la concentration de tubuline libre serait perçue par un capteur de nature inconnue qui inhiberait la protéine TTC5. En cas d'excès de tubuline, ce capteur serait alors lui-même inhibé, laissant la protéine TTC5 active. Elle reconnaîtrait et dégraderait alors spécifiquement, à l'aide d'une nucléase de nature inconnue, l'ARNm de tubuline en cours de traduction par les ribosomes. Le système est rapide, avec une fenêtre d'action de 1 à 3 heures dans la lignée cellulaire CHO (Cleveland et al., 1981; Pachter et al., 1987). Il semble par conséquent agir avant qu'un potentiel excès de tubuline ne puisse être toxique (Weinstein and Solomon, 1990). Dans l'ensemble, la production d'hétérodimères de tubuline est finement régulée dans la cellule. Elle est coordonnée et contrôlée au niveau co- et post-translationnel, permettant la génération constante de tubuline tout en évitant les excès.

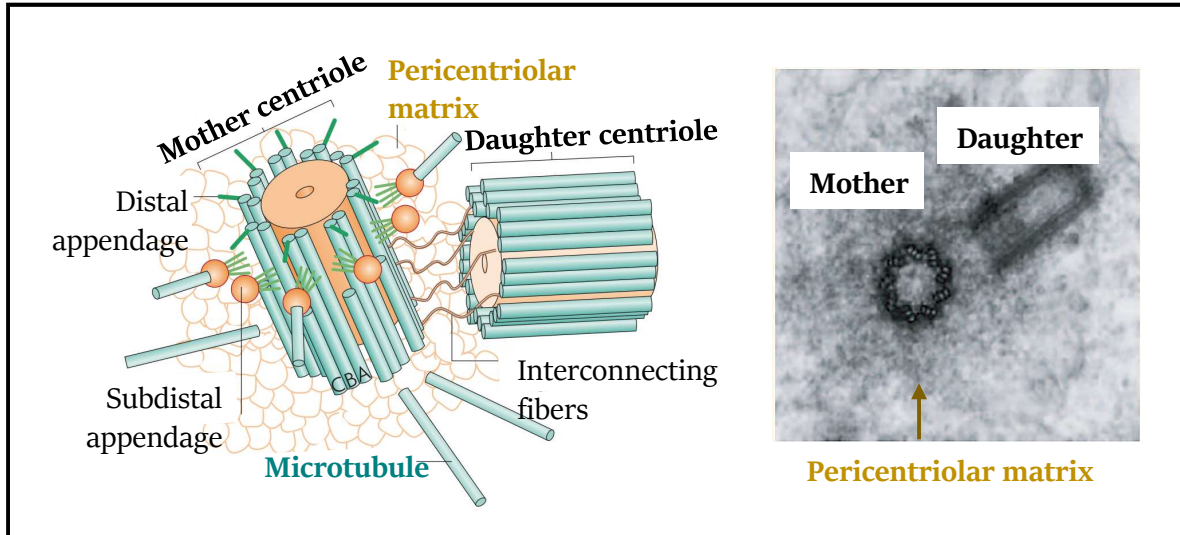


Figure 26 : Le centrosome. Le centrosome est constitué d'une paire de deux centrioles (mère et fille) arrangés de façon perpendiculaire. Les centrioles sont formés de neuf triplets de microtubules, et sont entourés de matrice péricentriolaire riche en tubuline γ . Ils sont par ailleurs couverts d'appendices distaux et subdistaux, qui servent notamment à la formation des cils et à l'ancrage des microtubules qui en émanent, respectivement (Bowler et al, 2019). Il est à noter que, chez l'Homme, les triplets de microtubules du centriole mère deviennent des doublets à la moitié de leur longueur (LeGuennec et al, 2021). Adapté de Bettencourt-Dias and Glover, 2007 (gauche) et de Sluder, 2005 (droite).

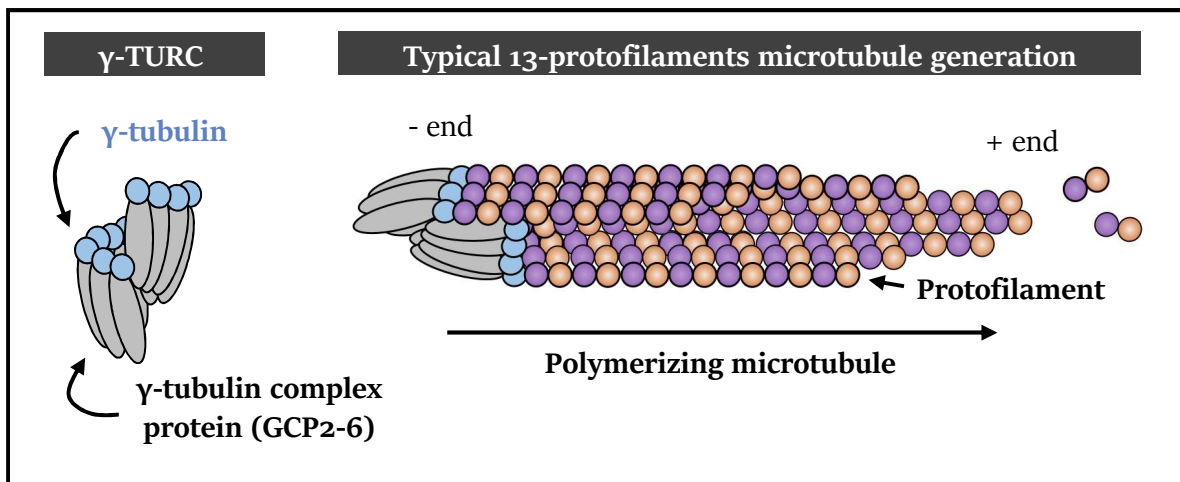


Figure 27 : La nucléation des microtubules par la tubuline γ . Au niveau du centrosome, la tubuline γ s'associe à plusieurs protéines pour former un complexe initiateur appelé γ -Tubulin Ring Complex (γ -TURC). Le γ -TURC servira de socle permettant l'assemblage des hétérodimères de tubuline α et β et la polymérisation des microtubules. En règle générale, le γ -TURC présente à sa surface 13 monomères de tubuline γ (un 14^{ème} est présent, mais est enfoui dans le complexe), conduisant la formation de microtubules à 13 protofilaments. Adapté de Roostalu and Surrey, 2017.

3. La polymérisation des hétérodimères en microtubules :

a. Les centres organisateurs des microtubules et la tubuline γ :

Faciliter la polymérisation des microtubules. La formation *de novo* de microtubules, appelée nucléation, est un processus cinétiquement défavorable et limitant. Il ne se produit de manière spontanée qu'à des concentrations très élevées de tubuline *in vitro* ($\approx 20 \mu\text{M}$) (Roostalu and Surrey, 2017) qui équivalent, voire dépassent, la concentration intracellulaire physiologique. Pour abaisser ce seuil, les cellules tirent parti de structures spécialisées appelées *MicroTubule Organizing Centers* (MTOCs). Elles établissent une sorte de matrice qui permet de diminuer la concentration critique de nucléation en catalysant les premiers cycles d'assemblage des hétérodimères. Dans les cellules animales, le principal MTOC est le centrosome (**Figure 26**). L'enveloppe nucléaire et l'appareil de Golgi peuvent également assurer cette fonction (Bugnard et al., 2005; Oddoux et al., 2013). La capacité nucléatrice des MTOCs repose sur la tubuline γ , qui fut à l'origine identifiée chez le champignon *Aspergillus* vers la fin des années 1990, soit presque 20 ans après ses cousins α et β (Oakley and Oakley, 1989). Elle fut ensuite retrouvée chez les mammifères, qui encodent quant à eux deux isotopes différents dans leurs génomes (Wise et al., 2000) : TUBG1, qui est ubiquitaire et dont l'inactivation chez la souris est létale ; et TUBG2 dont le spectre d'expression plus restreint permet aux souris délétées pour cette protéine de vivre normalement (Yuba-Kubo et al., 2005).

Nucléation des microtubules par les MTOCs. Dans les MTOCs, les tubulines γ sont complexées à de nombreuses protéines, les γ Tubulin Complex Protein (GCP), avec qui elles forment un complexe initiateur appelé γ Tubulin Ring Complex (γ TURC). Le complexe prend l'apparence d'une bague exposant à l'une de ses extrémités 13 tubulines γ (une 14^{ème} est présente, mais enfouie dans le γ TURC) qui constitueront un socle matriciel d'où s'allongeront ensuite les 13 profils caractéristiques des microtubules (**Figure 27**) (Thawani and Petry, 2021). Les polymères ainsi générés seront polarisés, avec d'un côté une extrémité stable adossée aux tubulines γ (*minus*), et de l'autre une extrémité dynamique où s'ajoutent les hétérodimères α et β (*plus*). Le mode d'assemblage des microtubules soulève la question de l'apparente universalité de leur configuration à 13 protofilaments, très majoritaire dans les cellules. Bien que spéculative, la raison de cet assemblage pourrait être liée à leur

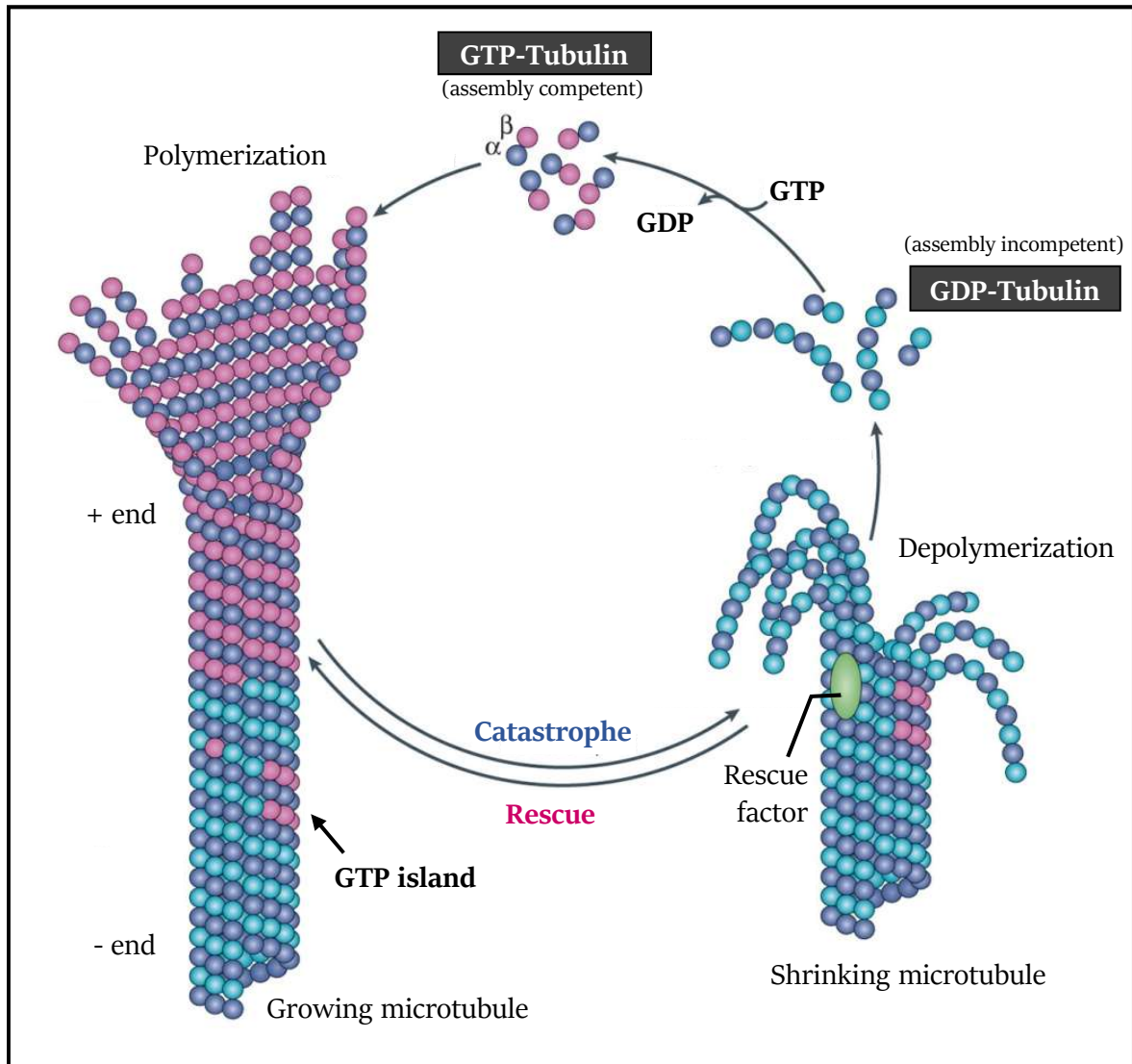


Figure 28 : L'instabilité dynamique des microtubules. Les microtubules polymérisent à partir d'hétérodimères de tubuline-GTP, qui s'ajoutent continuellement à l'extrémité + du polymère où ils forment une coiffe protectrice. Tant que la vitesse d'hydrolyse de leur GTP est inférieure à la vitesse de polymérisation du microtubule, la coiffe est conservée: le polymère continue de croître, et les contraintes liées aux changements conformationnels induits par les dimères-GDP s'accumulent dans la paroi. De par la nature stochastique du processus, il arrive parfois que tous les dimères de la coiffe réussissent à hydrolyser leur GTP. Dans ce cas, la coiffe est alors perdue et le polymère passe en phase de catastrophe. Il se dépolymérise, mais peut être secouru par des îlots de dimères n'ayant pas encore hydrolysé le GTP (GTP-island). Adapté de Akhmanova and Steinmetz, 2015

orientation dans le polymère. En particulier, les protofilaments configurés en 13 restent parallèles à l'axe longitudinal du microtubule. Par opposition, les protofilaments des microtubules configurés en 12 ou 14 par exemple suivent une trajectoire hélicoïdale dans le polymère, à l'image de deux brins d'ADN. Ces derniers constitueraient par conséquent de très mauvaises routes par rapport à leurs homologues triskeidécagonaux : les cargos cellulaires tourneraient sans cesse autour du microtubule, consommant plus d'énergie et augmentant leur chance de rencontrer des obstacles (Amos and Schlieper, 2005). Il existe cependant des exceptions, comme chez le nématode *C. Elegans* qui peut établir des microtubules à 11 (Chaaban et al., 2018) voire 15 (Fukushige et al., 1999) protofilaments, prêtant à cette géométrie un rôle fonctionnel malgré tout pertinent dans certaines situations.

b. La dynamique de polymérisation des microtubules, une histoire d'instabilité :

Les microtubules obéissent à un comportement de nature stochastique caractérisé par l'alternance de deux phases successives : des phases de dépolymérisation appelées catastrophe, suivies d'éventuelles phases de reprise appelées sauvetage. Le comportement des microtubules, baptisé *Instabilité Dynamique* fut rapporté pour la première fois par les américains Tim Mitchison et Marc Kirschner dans leur article emblématique datant de 1984 (Mitchison and Kirschner, 1984). Plus tard, ils comprirent que l'instabilité dynamique était conditionnée par les hétérodimères de tubuline, particulièrement par l'activité GTPase du site E des tubulines β (Hyman et al., 1992) (**Figure 28**). En particulier, les hétérodimères les plus à même d'être incorporés dans les microtubules sont ceux dont la tubuline β porte un GTP (dimère-GTP) (Hamel et al., 1986). Ils constituent à l'extrémité *plus* (où ils sont incorporés) une coiffe, composée jusqu'à plusieurs centaines de dimères-GTP (Seetapun et al., 2012) qui stabilise et protège le microtubule des catastrophes (Caplow and Shanks, 1996; Roostalu et al., 2020). Après leur incorporation dans le microtubule (Carlier and Pantaloni, 1981), la plupart des dimères-GTP hydrolysent leur GTP, conduisant à un changement conformationnel dans le dimère et générant des contraintes mécaniques dans les parois du polymère (Gudimchuk and McIntosh, 2021). Tant que la vitesse d'hydrolyse du GTP est inférieure à la vitesse de polymérisation du microtubule, la coiffe est conservée : le polymère croît et les contraintes s'accumulent. Il arrive parfois que la situation s'inverse, la coiffe est alors perdue et le microtubule entre en phase de catastrophe. Il pourra être secouru, notamment par des îlots de dimères qui n'ont pas encore hydrolysé

leur GTP (Dimitrov et al., 2008). Dans l'ensemble, l'instabilité dynamique est aujourd'hui bien décrite, mais des questions subsistent encore. Elles concernent notamment la nature et le type de contraintes générées par les dimères-GDP, qui impliqueraient cette fois-ci le domaine intermédiaire des tubulines α (Alushin et al., 2014; Gudimchuk and McIntosh, 2021).

c. Régulation de la dynamique des microtubules :

Les inhibiteurs de la dynamique des microtubules sont très utilisés en laboratoire pour perturber la dynamique des microtubules (Mühlethaler et al., 2021). L'un des plus connus est le taxol, qui est produit par l'If du Pacifique qui stabilise les microtubules. Il s'oppose aux alcaloïdes tels que la colchicine, ou la vincristine (produite par la Peruvénche de Madagascar), qui les dépolymérisent. Les conditions physico-chimiques, comme le pH, le calcium (Olmsted and Borisy, 1975) ou encore la température (Johnson and Borisy, 1977) peuvent également modifier la dynamique des microtubules. L'ensemble de ces études permirent d'estimer les conditions optimales de croissance des microtubules, qui furent appliquées au domaine expérimental. Il fut toutefois remarqué que la dynamique des microtubules *in vitro* était très différente de celle estimée dans les cellules *in vivo*. Par exemple, leur vitesse de croissance *in vitro* est de l'ordre du $\mu\text{m}/\text{minute}$, alors qu'elle est jusqu'à 5 fois supérieure dans les œufs de Xénope à concentration de tubuline égale (Kinoshita et al., 2001). L'une des hypothèses pouvant expliquer les différences se rapporte aux *Microtubule Associated Proteins* (MAPs), des protéines effectrices qui ajustent au besoin les propriétés et fonctions des microtubules. La plus connue est sûrement la protéine Tau, qui stabilise les microtubules dans les neurones (Drechsel et al., 1992). Il est à noter que la liaison aux microtubules et l'activité des MAPs sont finement régulées par l'intermédiaire du code tubuline, notion que nous allons à présent développer.

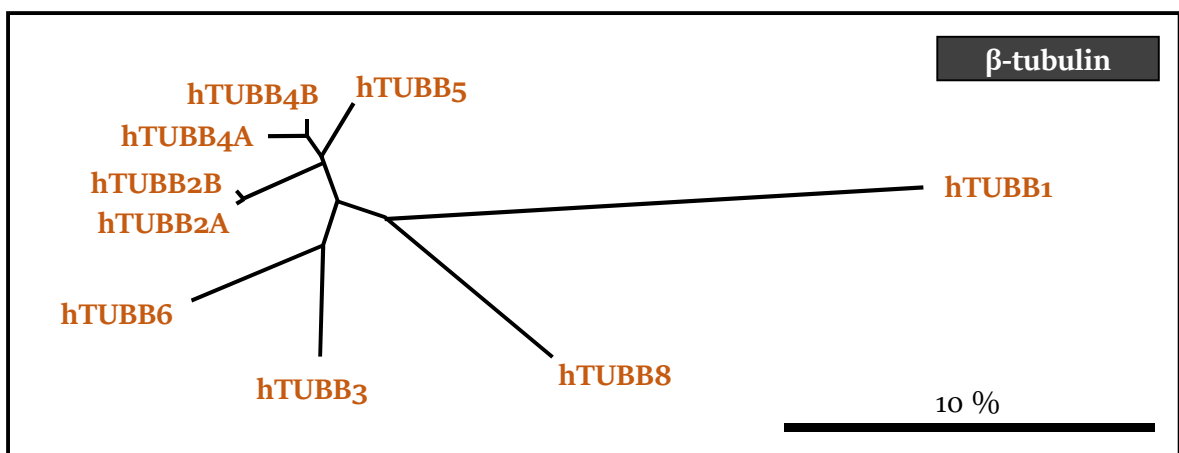
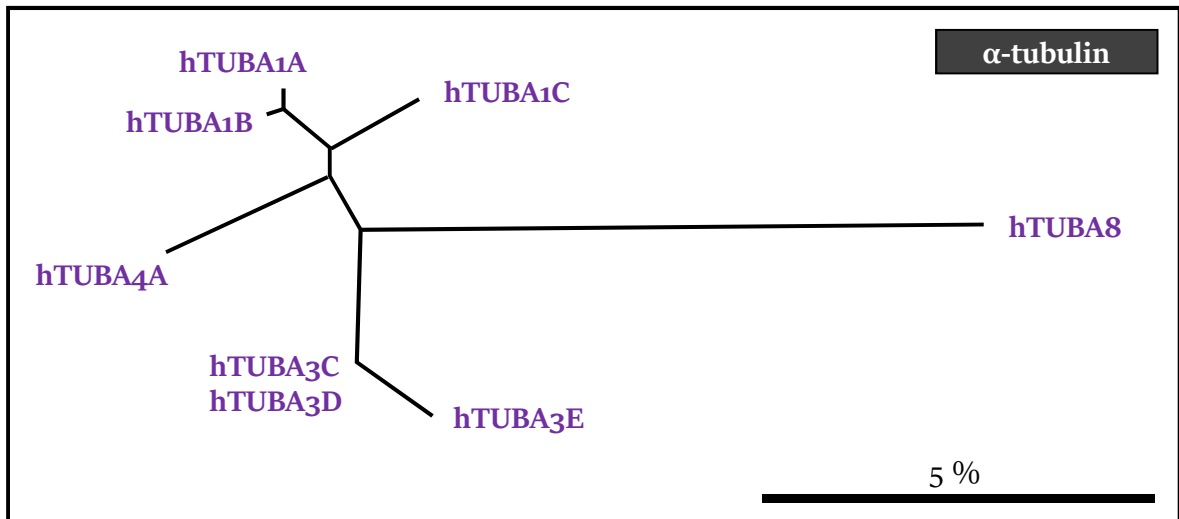


Figure 29 : Les isotypes de tubuline, forte homologie protéique. Dendrogramme illustrant la faible divergence entre les différents isotypes de tubulines α (haut) et de tubulines β (bas) humaines après alignement des séquences protéiques. Le degré de divergence est exprimé en pourcentage. Image de Carsten Janke (Institut Curie, Paris).

B. Le code tubuline, régulateur des fonctions des microtubules :

L'une des particularités qui rend le cytosquelette de microtubule si unique est son incroyable polyvalence fonctionnelle. Il peut assembler des structures très distinctes qui remplissent des fonctions fondamentalement différentes telles que le transport intracytoplasmique, la division, la motilité ou encore l'architecture cellulaire. Pendant longtemps, l'origine de cette diversité est restée inexplicite ; les microtubules apparaissaient comme de simples tubes biochimiquement inertes. La découverte des isotypes de tubuline, et plus tard de leurs modifications post-traductionnelles, ont cependant conduit les chercheurs à reconsidérer cette vision plutôt simpliste du polymère. Les isotypes ainsi que leurs modifications constituent en réalité deux variables susceptibles d'introduire une multitude de signaux biochimiques dans les microtubules. La somme des combinaisons établirait une sorte de code, initialement appelé *Multi-tubulin Hypothesis* (Greer and Shepherd, 1982) puis ensuite rebaptisé *Tubulin code* (Verhey and Gaertig, 2007). De cette manière, le code tubuline confère aux microtubules des propriétés mécaniques ou biochimiques particulières qui permettent, seules ou par l'intermédiaire d'effecteurs spécialisés, la mise en place ou le maintien de leurs fonctions. Dans cette partie, nous présenterons et discuterons des différents acteurs du code tubuline. Nous prendrons le plus souvent l'exemple du système nerveux central, où le code tubuline est le mieux caractérisé à ce jour.

1. Les isotypes de tubuline :

a. Particularités des isotypes :

Les tubulines α et β constituent deux familles de protéines indépendantes qui recensent chacune plusieurs variants appelés isotypes. Le génome humain encode ainsi 9 isotypes de tubuline α et 9 isotypes de tubuline β différents. Il est important de noter que la nomenclature des isotypes de tubuline peut, selon la date de publication de l'article d'intérêt, parfois prêter à confusion. Elle fut en effet révisée au cours des années 2000 à l'initiative du comité de nomenclature de l'Human Genome Organization, dans un souci d'harmonisation du nom des gènes chez l'Homme, la souris et le rat (Khodiyar et al., 2007). En raison de leur origine évolutive commune, les isotypes de tubuline partagent une très forte homologie protéique pouvant monter jusqu'à 98 % (Figure 29). La plupart des

divergences reste toutefois cantonnée au domaine C-terminal, qui porte la majorité des modifications post-traductionnelles et sur lesquelles nous reviendrons plus tard. Il est important de noter que les isotypes ne partagent pas le même profil d'expression dans les cellules. Les tubulines $\beta 2$ et $\beta 3$ sont par exemple exprimées dans le cerveau (Leandro-García et al., 2010), alors que l'isotype de tubuline $\beta 1$ n'est présent que dans la lignée plaquettaire (Wang et al., 1986). La tubuline $\beta 5$ est quant à elle exprimée dans les deux systèmes (Leandro-García et al., 2010; Schwer et al., 2001). L'expression concomitante de plusieurs isotypes de tubuline dans une cellule soulève la possibilité d'une association préférentielle de certains isotypes α et β . La littérature reste cependant très peu développée sur le sujet, notamment en raison d'un manque d'outils (particulièrement d'anticorps spécifiques de chaque isotype) permettant de purifier sélectivement des hétérodimères.

b. Importance des isotypes de tubuline dans les fonctions cellulaires :

Fonctions des isotypes de tubuline. En règle générale, l'inactivation génique d'une tubuline chez les organismes ayant dans leur génome plusieurs isotypes n'empêche pas leur développement ni leur croissance (Diggle et al., 2017; Latremoliere et al., 2018; Schwer et al., 2001). En revanche, les mutations de tubuline (très souvent faux-sens) peuvent être à l'origine de nombreuses pathologies appelées tubulinopathies (Chakraborti et al., 2016). Elles sont en majorité neurologiques, mais peuvent aussi se manifester dans plusieurs tissus ou organes isolés, prêtant ainsi des rôles spécifiques à certains isotypes selon les contextes tissulaires. L'un des premiers exemples rapportant l'importance des isotypes de tubuline vient de la Drosophile mâle, chez qui la tubuline $\beta 2$, mais pas la tubuline $\beta 3$, est nécessaire pour élaborer le flagelle des spermatozoïdes (Hoyle and Raff, 1990). Dans les neurones mécanosensibles du toucher du nématode *C. Elegans*, deux isotypes de tubuline spécifiques (parmi la dizaine encodée dans le génome) sont nécessaires pour former des microtubules à 15 protofilaments et ainsi rendre les neurones fonctionnels (Fukushige et al., 1999). Enfin, des mutations dans les gènes des tubulines $\alpha 4A$, $\alpha 8$ et $\beta 1$ ont révélé un rôle potentiellement clé des trois isotypes dans la production et le maintien de la forme discoïde des plaquettes (Kimmerlin et al., 2022a; Schwer et al., 2001; Strassel et al., 2019). Nous reviendrons sur cet exemple en détail plus tard.

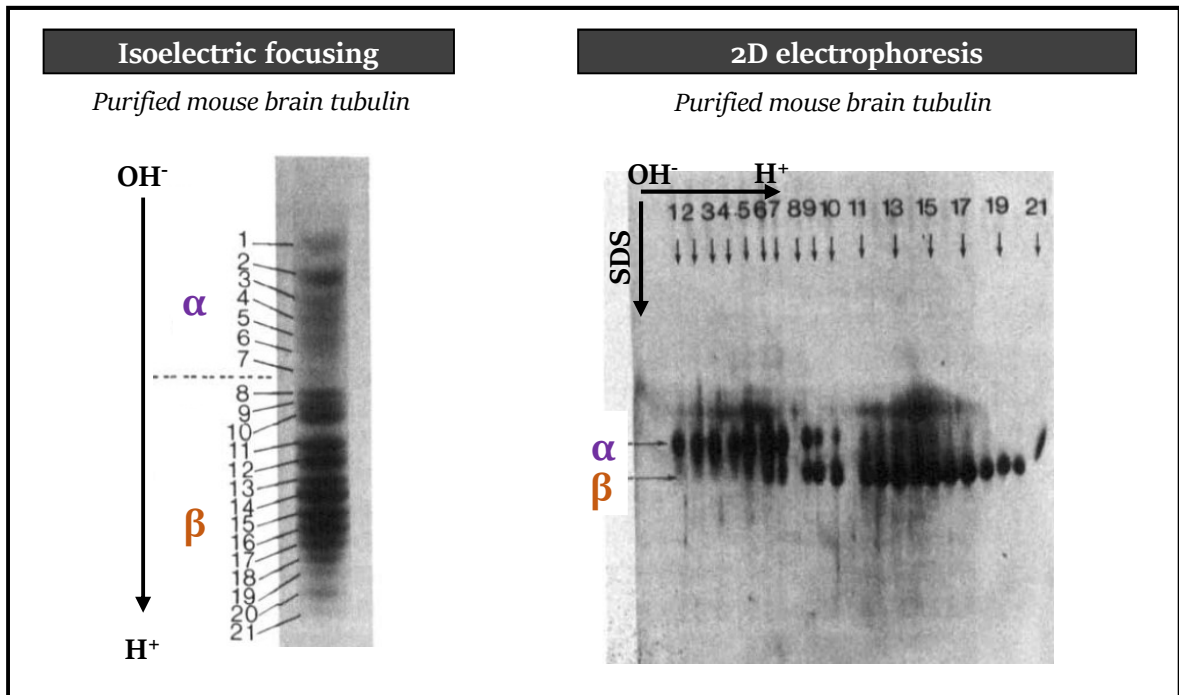


Figure 30 : Premiers indices des modifications post-traductionnelles de la tubuline. Les tubulines purifiées à partir de cerveaux de souris ont été séparées par électrophorèse à focalisation isoélectrique (gauche) ou par électrophorèse 2D (SDS puis focalisation isoélectrique) (droite). Tiré de Wolff et al, 1982.

Propriétés des isotypes de tubuline. L'une des questions majeures qui se pose aujourd'hui consiste à comprendre les raisons pour lesquelles certains isotypes peuvent être privilégiés par rapport à d'autres selon les processus cellulaires. Des études *in vitro* indiquent que les isotypes peuvent, intrinsèquement, moduler le comportement des microtubules. Les polymères isotypiquement purs de tubuline β_3 sont par exemple beaucoup plus instables que ceux formés de tubuline β_2 , avec une fréquence de catastrophe nettement plus élevée. Les différences sont conservées si les parties C-terminales des deux isotypes sont échangées, attribuant ainsi l'effet au cœur globulaire de chaque isotype (Pamula et al., 2016). Des résultats comparables ont été obtenus avec des tubuline β_3 exemptes de modifications post-traductionnelles (Vemu et al., 2017). Dans l'ensemble cependant, les données concernant l'influence des isotypes de tubuline sur le comportement et les fonctions des microtubules restent peu nombreuses. L'une des explications serait liée à une limite technique : isoler des hétérodimères isotypiquement purs est longtemps resté une tâche ardue. En effet, jusqu'à peu, la communauté travaillait beaucoup à partir de tubulines purifiées de cerveau, un organe naturellement très riche en microtubules. Les méthodes classiques de purification de tubuline (par cycles successifs de polymérisation et de dépolymérisation, entrecoupés d'étapes d'ultracentrifugation pour n'isoler que les polymères) présentent cependant des biais dont i) la composition relative en isotypes, inconnue et qui est limitée à ceux exprimés dans le cerveau et surtout à ceux qui se polymérisent lors des cycles de purification ; ii) la présence éventuelle de MAPs contaminantes co-purifiées dans le procédé et ; iii) la présence de modifications post-traductionnelles, très enrichies sur les tubulines de cerveau et qui influencent également le comportement des microtubules. Des techniques plus sophistiquées, basées sur la production d'hétérodimères de tubulines recombinantes pures et non modifiées dans des cellules d'insectes, permettent depuis peu de s'affranchir de ces limites (Minoura et al., 2013; Ti et al., 2020; Vemu et al., 2017). Elles restent toutefois encore peu utilisées aujourd'hui.

2. Les modifications post-traductionnelles de la tubuline :

Les techniques d'électrophorèse basées sur la focalisation isoélectrique des protéines ont révélé la présence de plus d'une vingtaine de spots à partir de tubuline purifiée de cerveau (Figure 30) (Wolff et al., 1982). Le chiffre excédant largement le nombre d'isotypes identifiés, les modifications post-traductionnelles furent rapidement suspectées pour expliquer cette observation. Depuis, plusieurs

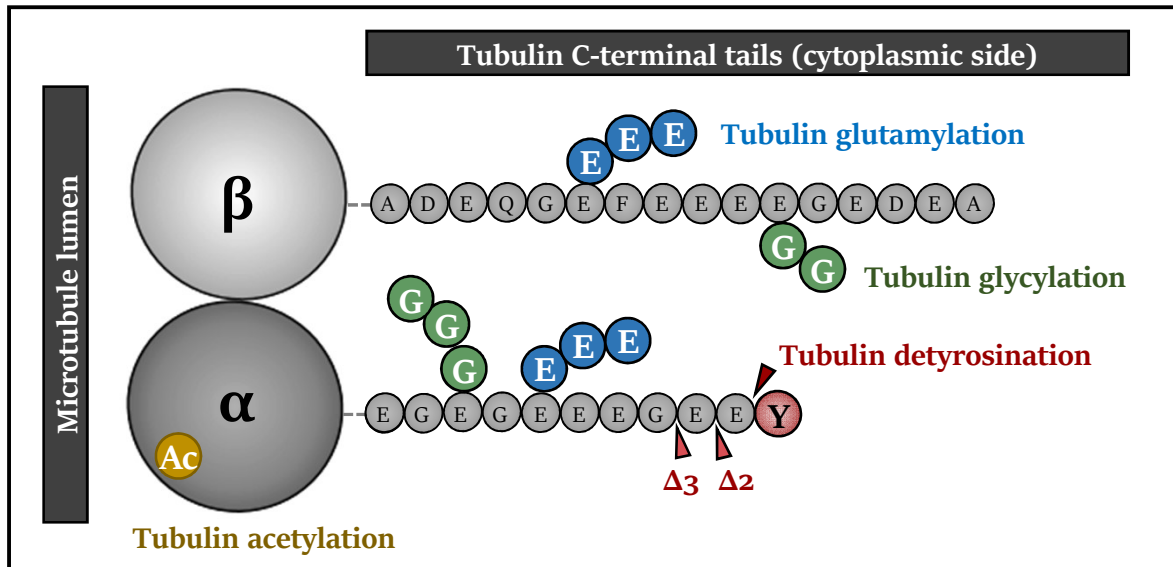


Figure 31 : Les principales modifications post-traductionnelles des tubulines α et β . La majorité des modifications sont localisées dans la partie C-terminale des tubulines, à l'exception de l'acétylation de la lysine K40 des tubulines α qui est retrouvée dans la lumière du polymère. L'acétylation (jaune), la détyrosination et ses variantes $\Delta 2$ et $\Delta 3$ qui désignent le retrait de la tyrosine C-terminale, et des deux glutamates qui la suivent (rouge), respectivement, sont exclusifs aux tubulines α . La glutamylation et la glycylation, qui consistent au rajout ou au retrait de chaîne latérales de glutamates (bleu) ou de glycine (vert) respectivement, sont quant à elles pan-tubulines.

modifications ont été identifiées dans les tubulines, essentiellement dans la partie C-terminale (Janke and Magiera, 2020). Elles participent à la diversité biochimique et fonctionnelle des microtubules, et constituent la deuxième variable du code tubuline. Les modifications post-traductionnelles des tubulines confèrent aux microtubules des propriétés de nature mécanique, mais également de nature biochimique en régulant leur interaction avec les MAPs. Ici, nous traiterons des modifications les plus étudiées à ce jour : l'acétylation, la détyrosination, la glutamylation et la glycylation (Figure 31). Elles sont toutes réversibles, contrôlées par un système d'enzymes plus ou moins élaboré, et modulent toutes à leur échelle les fonctions des microtubules.

a. L'acétylation de la tubuline :

Découverte et enzymes impliquées. L'acétylation de la tubuline fut découverte dans les années 1980 par une équipe française chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (L'Hernault and Rosenbaum, 1983). Elle fut par la suite retrouvée chez la plupart des espèces eucaryotes, et notamment chez les mammifères, attachée sur plusieurs lysines des tubulines α et β (Sadoul and Khochbin, 2016). La majorité des sites d'acétylation identifiés reste néanmoins très mal caractérisée. Le plus étudié (en réalité, quasiment le seul) est l'acétylation de la lysine K40 des tubulines α , résidu très conservé chez les mammifères qui reçut beaucoup d'attention suite au développement rapide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement cette modification (LeDizet and Piperno, 1987; Piperno and Fuller, 1985). Par conséquent, l'extrême majorité des articles traitant de l'acétylation de la tubuline se réfère implicitement à l'acétylation de la K40 des tubulines α . De manière intéressante, la modification fait un peu figure d'exception de par sa localisation sur le microtubule. Elle n'est en réalité pas exposée à la surface du polymère comme la majorité des modifications, mais est à l'inverse enfouie dans la lumière du polymère (Nogales et al., 1999). Les enzymes qui catalysent sa mise en place sont les acetyl-transférases ARD1-NAT1, ELP3, San, GCN5 et α TAT1. La réaction inverse est quant à elle assurée par les désacetylases SIRT2 et HDAC6 (Sadoul and Khochbin, 2016). La modification semble toutefois assurée par une seule enzyme de chaque type chez les mammifères, à savoir α TAT1 et HDAC6 : leur absence chez la souris entraîne ainsi une très forte hypo- et hyperacétylation dans l'ensemble des tissus, respectivement (Kalebic et al., 2013; Zhang et al., 2008). Nous préciserons ici

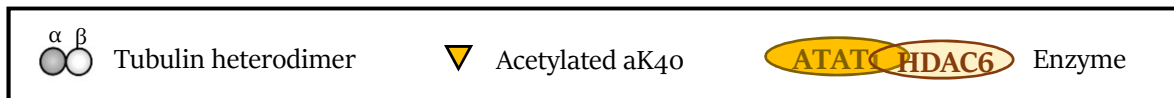
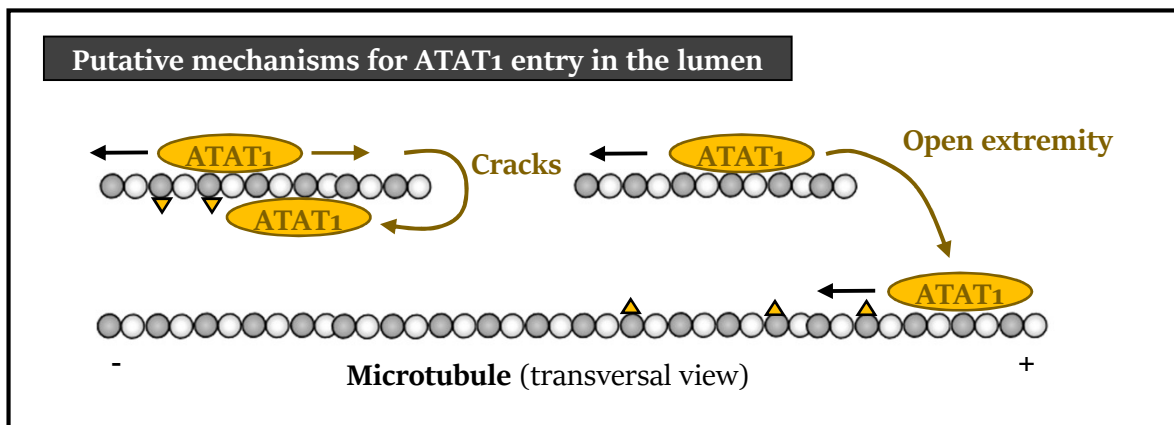
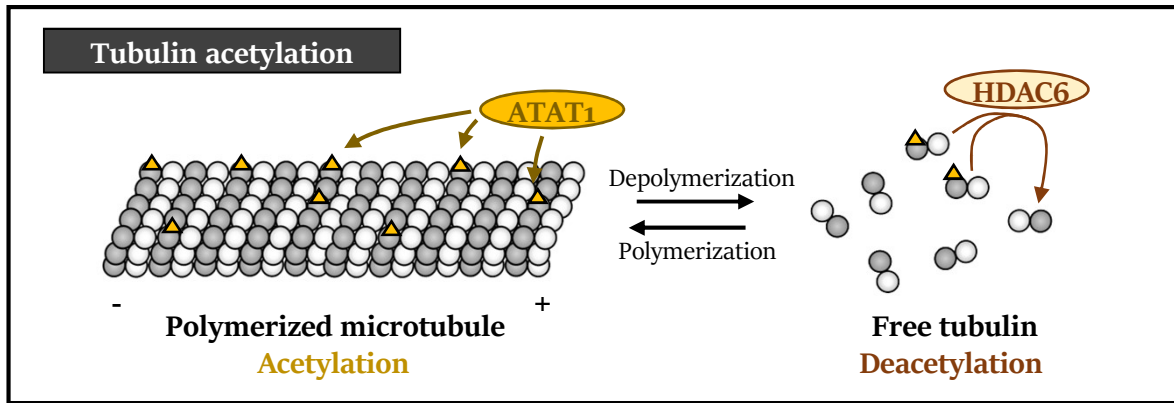


Figure 32 : L'acétylation de la lysine K40 des tubulines α . (Haut) L'acétylation des tubulines α est assurée par l'acetyl-transférase ATAT1. Elle modifie préférentiellement les polymères, à l'inverse de la désacétylase HDAC6. (Bas) Le mécanisme d'accès de l'enzyme ATAT1 au lumen des microtubules est aujourd'hui mal connu. Elle pourrait accéder à l'intérieur des microtubules par l'intermédiaire de brèches dans la paroi du polymère, ou par les extrémités des microtubules. Adapté de Janke and Montagnac, 2017.

que l'acétyltransférase α TAT1 modifie préférentiellement les polymères (Shida et al., 2010), à l'inverse de l'enzyme désacétylase HDAC6 qui préfère de son côté les hétérodimères libres (Figure 32) (Skultetyova et al., 2017). Les mécanismes permettant à l'enzyme α TAT1 d'accéder au lumen des microtubules sont toutefois encore mal compris (Janke and Montagnac, 2017).

Fonctions. Dans la littérature, l'acétylation de la tubuline est très souvent utilisée comme indicateur de la stabilité des microtubules. L'idée provient notamment d'études réalisées avec les agents dépolymérisants des microtubules, qui entraînent une disparition préférentielle des microtubules non-acétylés (LeDizet and Piperno, 1986). Il est possible que la modification soit une conséquence directe d'une préférence de l'enzyme α TAT1 pour les polymères. Plus les microtubules sont stables, plus ils auront tendance à être modifiés. Plusieurs indices tendent cependant à penser que l'acétylation est plutôt une cause, au moins partielle, de cet effet pro-stabilisant. L'acétylation fut récemment rapportée pour conférer aux microtubules *in vitro* une meilleure résistance au stress mécanique (Portran et al., 2017). Elle réduirait la force des contacts inter-protofilament des microtubules (Eshun-Wilson et al., 2019), diminuant leur rigidité flexionnelle, les rendant ainsi plus souples et permissifs aux contraintes physiques. L'effet pro-stabilisant de l'acétylation est toutefois contesté. En effet, les microtubules des fibroblastes de souris inactivés pour α TAT1, qui sont hypoacétylés, sont paradoxalement plus résistants à la dépolymérisation par le nocodazole par rapport aux contrôles non inactivés (Kalebic et al., 2013). Pour réconcilier les résultats, l'une des hypothèses serait l'implication de MAPs dont l'expression varierait selon le contexte cellulaire. Dans les fibroblastes de rat, les microtubules acétylés sont ainsi, par exemple, plus sensibles aux cassures induites par la katanine, à l'inverse de ceux des neurones qui sont en partie protégés par la protéine Tau (Sudo and Baas, 2010). Malgré ces différences, le rôle de l'acétylation de la tubuline à l'échelle de l'organisme semble modeste. En effet, les souris délétées des enzymes α TAT1 ou HDAC6 se développent normalement, sont fertiles et ne montrent pas de défauts majeurs (Kalebic et al., 2013; Zhang et al., 2008). Les souris inactivées α TAT1 présentent néanmoins de légères anomalies cérébrales, accompagnées d'un défaut périphérique causant une baisse de sensibilité au toucher (Morley et al., 2016). Chez l'Homme, aucune pathologie n'a encore été reliée à des anomalies d'acétylation de la tubuline. En

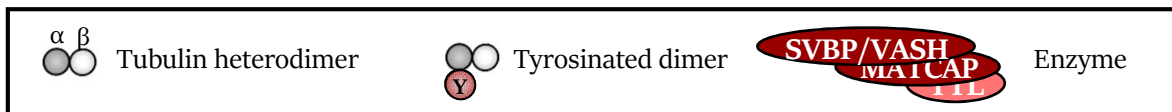
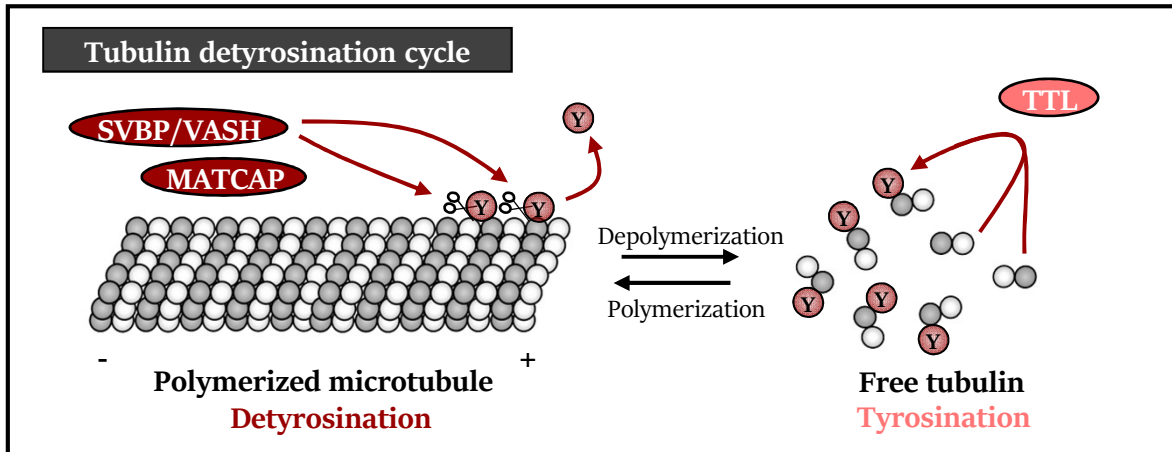


Figure 33 : Le cycle de détyrosination de la tubuline α . La détyrosination des tubulines α est assurée par le complexe détyrosinase VASH/SVBP. Il modifie préférentiellement les polymères, à l'inverse de la tyrosinase TTL qui re-tyrosine quant à elle plutôt les hétérodimères libres.

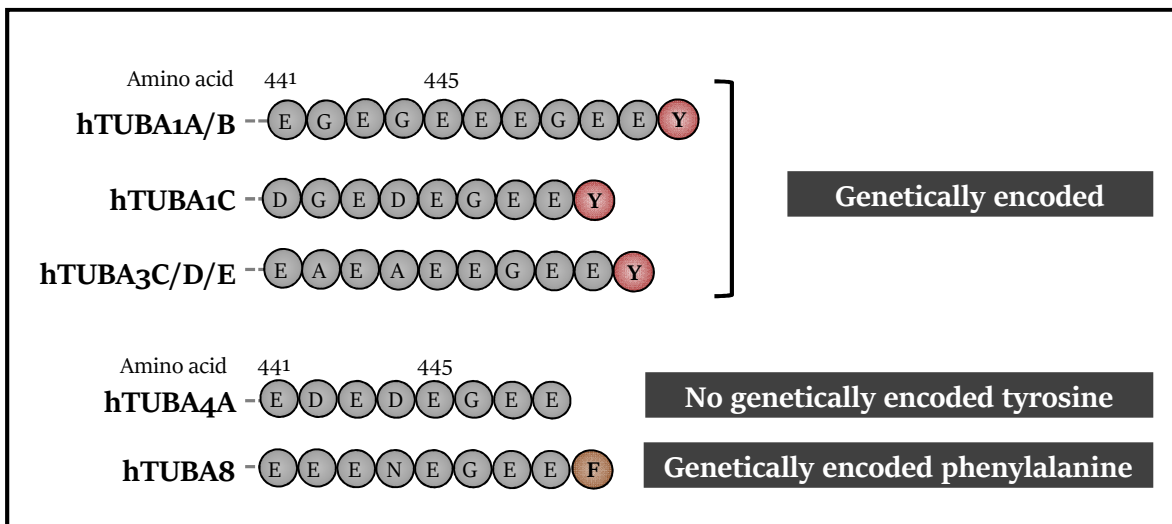


Figure 34 : Les tubulines α n'encodent pas toutes génétiquement une tyrosine C-terminale. Les tubulines α 1A/B/C et α 3C/D/E encodent génétiquement la tyrosine C-terminale, à l'inverse de la tubuline α 4A qui n'en encode pas. La tubuline α 8, quant à elle, encode à la place une phénylalanine.

revanche, dans le cas des maladies neurodégénératives ou de cancers, son niveau est souvent diminué, lui prêtant une potentielle implication qui reste toutefois à démontrer (Sadoul et al., 2018).

b. La détyrosination de la tubuline :

Découverte et cycle enzymatique. La détyrosination est une modification réversible qui consiste au retrait de la tyrosine C-terminale génétiquement encodée des tubulines α (Sanyal et al., 2021). Elle fut découverte vers la fin des années 1970 par les travaux successifs de chercheurs argentins, qui rapportèrent l'incorporation et le retrait de tyrosine radiomarquée dans les tubulines *in vitro* (Barra et al., 1974; Hallak et al., 1977). L'enzyme catalysant le rajout de cette tyrosine fut ensuite nommée Tubulin-Tyrosine Ligase (TTL) (Raybin and Flavin, 1975), mais ne sera identifiée qu'en 1993 (Ersfeld et al., 1993). L'enzyme qui catalyse à l'inverse le retrait de la tyrosine C-terminale, initialement appelée Tubulin Carboxypeptidase (TCP), échappa quant à elle très longtemps à l'identification. En réalité, il existe deux enzymes détyrosinases différentes. La première fut rapporté en 2017 par deux équipes indépendantes, une française et une hollandaise (Aillaud et al., 2017; Nieuwenhuis et al., 2017). L'équipe française tira parti d'inhibiteurs spécifiques de l'activité TCP, accrochés à des billes qui furent utilisées comme des hameçons et qui permirent d'attribuer l'activité détyrosinase aux deux vasohibins VASH1 et VASH2. De manière inattendue, les vasohibins doivent être complexées avec la petite protéine SVBP afin d'être fonctionnelles, expliquant pourquoi l'enzyme fut si difficile à identifier jusque-là par les techniques de purification classiques. L'équipe hollandaise obtint de son côté des résultats similaires, en partant toutefois d'une technique fondamentalement différente, basée sur un criblage génétique par mutagenèse aléatoire sur de cellules humaines haploïdes. La même technique leur permit d'identifier très récemment une deuxième détyrosinase, appelée MATCAP (Landskron et al., 2022). Nous noterons que, quelle que soit l'enzyme, la détyrosination se fait préférentiellement sur les polymères (Kumar and Flavin, 1981; Landskron et al., 2022), par opposition à la réaction de tyrosination qui se fait plutôt sur les hétérodimères libres (Arce et al., 1978) (Figure 33). Nous noterons enfin que les tubuline α n'encodent pas toutes génétiquement de tyrosine C-terminale : c'est le cas de la tubuline α 4A, qui n'en possède pas, et de la tubuline α 8, qui encode à la place une phénylalanine (Figure 34). Le niveau de détyrosination peut ainsi être contrôlé par i) les différentes enzymes et ii) les différents isotopes néosynthétisés.

Fonctions. La détyrosination, comme l'acétylation, est souvent présentée comme un indicateur de microtubules stables. Les premières observations ont en effet pu montrer qu'après traitement au nocodazole, les seuls microtubules qui résistaient à la dépolymérisation étaient détyrosinés (Kreis, 1987). Il est possible que la détyrosination soit simplement une conséquence de la préférence du complexe détyrosinase pour les microtubules polymérisés. Il semble toutefois que la modification soit, comme l'acétylation, une cause plutôt qu'une conséquence de cet effet pro-stabilisant. Bien qu'il n'existe aujourd'hui pas d'études démontrant un effet direct structural de la modification sur le microtubule, elle semble toutefois pouvoir agir indirectement au travers de MAPs. Elle inhibe ainsi l'activité de la kinésine dépolymérisante MCAK, dont la délétion dans les fibroblastes permet aux microtubules tyrosinés d'égaliser la stabilité de ses homologues détyrosinés (Peris et al., 2009). Par ailleurs, la détyrosination fut également rapportée pour influencer *in vitro* la liaison et l'activité d'un certain nombre de MAPs dont les protéines motrices (McKenney et al., 2016; Sirajuddin et al., 2014) ou la famille de protéines CAP-Gly telle que la CLIP-170 (Peris et al., 2006). Dans les neurones, les niveaux de détyrosination sont importants pour réguler l'organisation du transport intracellulaire. Ils seraient ainsi nécessaires pour le transport rétrograde axonal (depuis l'axone vers le corps cellulaire) assuré par la dynéine. En particulier, la liaison de la dynéine serait facilitée sur les microtubules tyrosinés qui sont enrichis à l'extrémité distale de l'axone (Nirschl et al., 2016). L'importance de la modification dans les neurones *in vivo* est illustrée par les souris inactivées pour la tyrosinase TTL, chez qui les microtubules sont hypotyrosinés. L'inactivation est en effet létale peu après la naissance des individus, probablement dû à un développement anormal des structures cérébrales (Erck et al., 2005). Les souris invalidées pour SVBP et/ou MATCAP, qui sont dépourvues d'activité détyrosinase et chez qui les microtubules sont à l'inverse hypertyrosinés, sont quant à elles viables. Elles souffrent toutefois de microcéphalie associées à des anomalies comportementales, des défauts qui sont en partie retrouvés chez les patients porteurs de mutations dans le gène de SVBP (Landskron et al., 2022; Pagnamenta et al., 2019). Enfin, à part le système nerveux, la détyrosination est impliquée dans d'autres types cellulaires comme le muscle cardiaque. En effet, les cardiomyocytes de souris dont les microtubules ont été massivement détyrosinés (en réprimant l'expression de l'enzyme TTL) montrent une nette réduction dans leur capacité contractile par rapport aux contrôles *in vitro* (Robison et al., 2016). En accord avec ces résultats, l'hypotyrosination des microtubules est associée

chez l'Homme à des anomalies cardiaques de nature contractile comme l'insuffisance cardiaque ou les cardiomyopathies hypertrophiques (Schuldt et al., 2021).

c. Les tubulines $\Delta 2$ et $\Delta 3$:

Lors des premières expériences de détyrosination dans les années 1970, un élément curieux fut remarqué : les tubulines α détyrosinées ne sont pas toutes re-tyrosinables par la TTL. Dans un cerveau de rat de 120 jours, la tubuline non tyrosinable représente $\approx 50\%$ de la tubuline α totale (Barra et al., 1980). En réalité, cette large fraction représente deux variantes de tubulines détyrosinées, qui sont nommées $\Delta 2$ (Paturle-Lafanechère et al., 1991) et $\Delta 3$ (Aillaud et al., 2016). Elles consistent respectivement au retrait d'un ou des deux glutamates encodés génétiquement et précédant la tyrosine C-terminale, ceci par les déglutamylases de la famille des Cytosolic CarboxyPeptidase (CCP) (Aillaud et al., 2016; Rogowski et al., 2010; Tort et al., 2014). Les tubulines $\Delta 2$ et $\Delta 3$ étant non-tyrosinables, il est possible que les modifications puissent permettre la sortie des tubulines du cycle de détyrosination. Leur importance biologique n'est cependant pas encore établie. La tubuline $\Delta 2$, qui représente 35% de la tubuline α totale dans le cerveau de rat, est toutefois associée aux microtubules stables (Paturle-Lafanechère et al., 1994). La tubuline $\Delta 3$, qui représente une petite fraction de la tubuline α totale (1%) et est à l'inverse associée aux microtubules dynamiques (Aillaud et al., 2016).

d. Les polymodifications de la tubuline, focus sur glutamylation et glycylation :

Par opposition à l'acétylation et à la détyrosination ainsi que ses variantes, cantonnées aux tubulines α , la glutamylation et glycylation sont pan-tubuline. Elles consistent en un cycle réversible d'ajout et de retrait d'une chaîne latérale plus ou moins longue de glutamate ou de glycine, respectivement. Les chaînes latérales sont attachées à la séquence primaire des tubulines α et β par l'intermédiaire de glutamates encodés dans leur partie C-terminale.

La glutamylation :

Découverte et enzymes impliquées. La glutamylation des tubulines fut identifiée par une équipe française dans les années 1990 à partir d'extraits de cerveaux de souris. Par spectrométrie de masse,

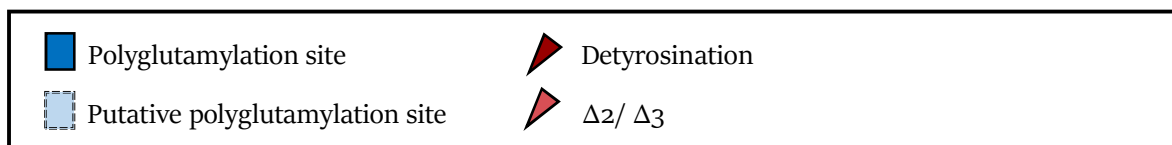
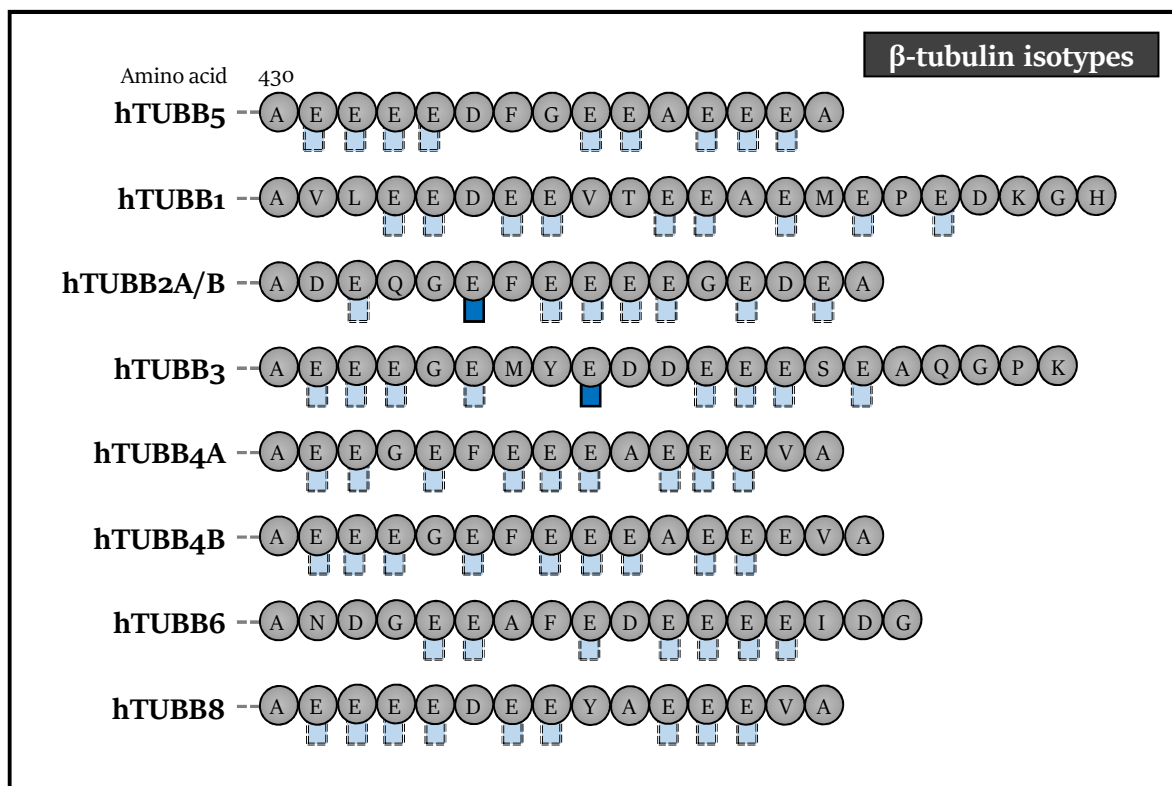
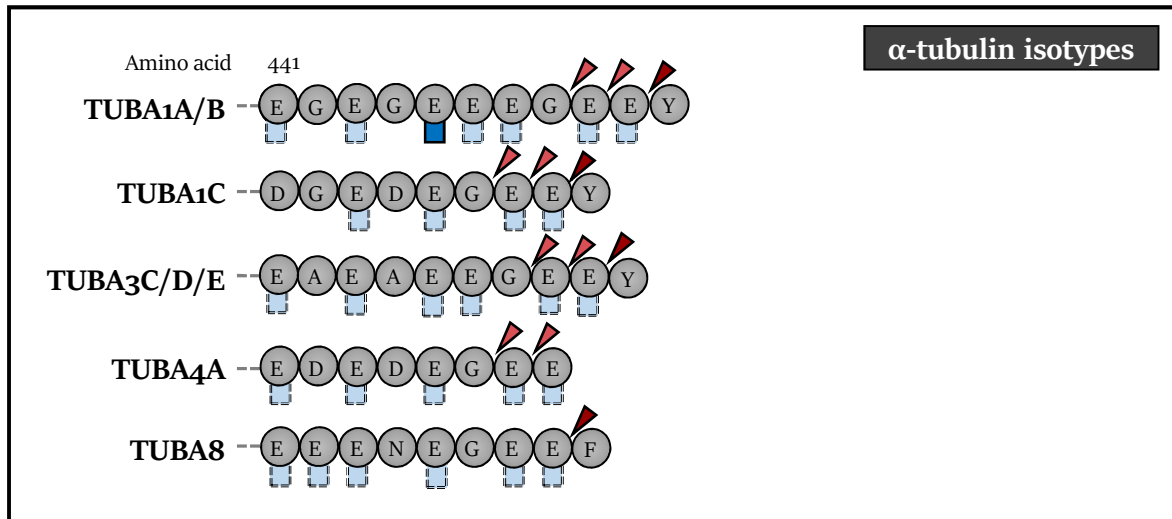


Figure 35 : Les sites de (poly)glutamylation de la queue C-terminale des tubulines α et β. La séquence C-terminale de chaque isotype de tubuline est présentée. Tous les sites connus et hypothétiques de glutamylation, de même que les sites de detyrosination et de ses variantes Δ2 et Δ3 sont indiqués. Adapté de Janke, 2014.

il fut découvert que le glutamate 445 de la tubuline α 1A portait une chaîne latérale composée d'1 à 5 acides glutamiques (Eddé et al., 1990). Très rapidement, la modification fut retrouvée sur d'autres glutamates C-terminaux des tubulines α et β (Figure 35). Il faudra toutefois attendre plusieurs années avant la découverte des enzymes impliquées dans cette modification, appelées glutamylases pour celles qui la rajoute, et déglutamylases pour celles qui la retire. La première glutamylase à être identifiée fut la Tubulin-Tyrosine Ligase Like 1 (TTLL1), nommée ainsi pour son homologie avec le domaine catalytique de la tyrosinase TTL et caractérisée à l'aide d'anticorps générés contre une fraction protéique de cerveau de souris enrichie pour son activité (Janke et al., 2005; Regnard et al., 2003). La première déglutamylase à être identifiée fut la Cytosolic Carboxypeptidase 1 (CCP1), caractérisée notamment *in vitro* à l'aide de tubuline de cerveau, très fortement polyglutamylée, dont le niveau de modification diminuait drastiquement après incubation avec l'enzyme (Rogowski et al., 2010). Des analyses bio-informatiques comparatives ont également révélé la présence de nombreux homologues à TTLL1 et CCP1 dans les génomes animaux. Ils furent extensivement caractérisés *in vitro*, si bien qu'elles constituent aujourd'hui chacune une famille d'enzyme à part entière (Tableau 3, page suivante). Les glutamylases TTLLs et déglutamylases CCPs sont ainsi très nombreuses et présentent, pour les TTLLs, des préférences *in vitro* pour i) un type de substrat (tubuline α ou β) et ii) un type de réaction (initiation ou élongation des chaînes) ; et pour les CCPs, des préférences *in vitro* pour un type de réaction (raccourcissement de la chaîne ou retrait du glutamate de branchement). Leurs préférences restent toutefois flexibles, dans la mesure où les enzymes peuvent se compenser si exprimées dans la même cellule (Magiera et al., 2018). Il est à noter que les TTLLs modifient préférentiellement les microtubules (Regnard et al., 1998), par opposition aux déglutamylases qui acceptent autant les polymères que les dimères solubles (Audebert et al., 1993). De plus, la modification n'est pas exclusive aux tubulines ; les TTLLs et CCPs peuvent ainsi modifier d'autres substrats tels que Mad2, une protéine du cycle cellulaire impliquée dans la maturation des mégacaryocytes (Ye et al., 2014).

Fonctions. La glutamylation des tubulines est très présente dans les neurones (Audebert et al., 1993; Wolff et al., 1992) et les cellules ciliées (Kann et al., 2003). Elle y remplit de nombreuses fonctions.

Enzyme	Substrate preference	Reaction
<i>Tubulin glutamylases TTLL</i>		
TTLL1	α and β	Elongation
TTLL2	unknown	unknown
TTLL4	β	Initiation
TTLL5	α	Initiation
TTLL6	α	Elongation
TTLL7	β	Initiation and elongation
TTLL9	α	Elongation
TTLL11	α	Elongation
TTLL13	α	Elongation
<i>Tubulin deglutamylases CCP</i>		
CCP1	α and β	Shortening
CCP2	α and β	Shortening
CCP3	α and β	Shortening
CCP4	α and β	Shortening
CCP5	α and β	Branching E removal
CCP6	α and β	Shortening

Tableau 3: Les enzymes impliquées dans la (poly)glutamylation des tubulines α et β . Les glutamylases TTLLs et les déglutamylases CCPs, ainsi que leur préférence de substrat (tubuline α et/ou β) et de réaction (initiation et/ou élongation des chaînes latérales) sont indiqués.

Elle est notamment impliquée dans le transport intracytoplasmique, en favorisant l'activité des protéines motrice de type kinésines (Ikegami et al., 2007; Sirajuddin et al., 2014), ou dans le battement des cils (Yang et al., 2021). La glutamylation est également capable de réguler la dynamique des microtubules, notamment via la spastine. La spastine est une MAP de la famille des AAA ATPase qui introduit des cassures dans les microtubules et dont l'action est conditionnée par la longueur des chaînes latérales de glutamate (Lacroix et al., 2010; Valenstein and Roll-Mecak, 2016). Plus celles-ci seront longues, plus son activité sur les microtubules diminuera, montrant ainsi qu'une même modification peut à la fois sensibiliser et protéger les polymères selon le contexte. Étant donné le rôle de la spastine dans la paraplégie spastique familiale (Salinas et al., 2007), une maladie neurodégénérative héréditaire, il est possible que la glutamylation soit impliquée dans la pathogenèse de cette maladie. L'importance de la modification dans les pathologies de type neurodégénératif fut exemplifiée par des lignées de souris mutées ou invalidées pour la déglutamylase CCP1 (Magiera et al., 2018; Mullen et al., 1976). Elles présentent notamment des défauts d'origine centrale, qui se manifestent par une dégénérescence rapide des cellules de Purkinje du cervelet provoquant une ataxie (Magiera et al., 2018). Les défauts sont associés à une hyperglutamylolation des tubulines (Bodakuntla et al., 2021), caractéristique des régions cérébrales où CCP1 est majoritaire (Rogowski et al., 2010). Dans les régions non affectées, comme le cortex cérébral, l'absence de CCP1 est compensée par la déglutamylase CCP6 (Magiera et al., 2018). Bien que les mécanismes ne soient pas encore clairement établis, la pathologie est une conséquence directe d'une hyperglutamylolation des microtubules, indépendante de la spastine mais impliquant une perturbation du transport axonal (Bodakuntla et al., 2021; Gilmore-Hall et al., 2019; Magiera et al., 2018). Très récemment, des mutations dans le gène CCP1 ont été identifiées chez des patients atteints de microcéphalie. Ils récapitulent les principaux défauts des souris mutées ou déficientes pour cette enzyme, confirmant le poids de la modification chez l'Homme (Shashi et al., 2018). Pour finir, la glutamylation de la tubuline est également importante en dehors du système nerveux, notamment dans les cellules ciliées. Par exemple, l'inactivation de la TTLL1 (qui entraîne une hypoglutamylation), perturbe le battement des cils motiles des cellules tapissant l'épithélium trachéal et se manifeste chez la souris par une accumulation de mucus et des gênes respiratoires (Ikegami et al., 2010). De même, l'inactivation de la TTLL9 chez la souris entraîne

Enzyme	Substrate	Reaction
<i>Tubulin glycyloses TTLL</i>		
TLL3	α and β	Initiation
TLL8	α and β	Initiation
TLL10*	α and β	Elongation
<i>Tubulin deglycyloses : unknown</i>		

Tableau 4: Les enzymes impliquées dans la (poly)glycylation des tubulines α et β . Les glycyloses TTLLs ainsi que leur préférence de substrat (tubuline α et/ou β) et de réaction (initiation et/ou élongation des chaînes latérales) sont indiquées. Dans le cas des déglycyloses, aucune enzyme n'a encore été identifiée à ce jour. * Inactif chez l'Homme.

une malformation des spermatozoïdes qui se répercute négativement sur la mobilité des spermatozoïdes et qui provoque *in fine* l'infertilité chez les mâles (Konno et al., 2016).

La glycylation :

Découverte et enzymes impliquées. La glycylation de la tubuline est une modification très particulière dans le sens où elle n'est retrouvée, pour l'instant, que dans les microtubules des cils et flagelles (Janke and Magiera, 2020). Elle fut découverte par spectrométrie de masse dans la Paramécie, un organisme unicellulaire recouvert de cils dont les microtubules portent des chaînes allant jusqu'à 32 glycines consécutives (Redeker et al., 1994). Les sites de glycylation semblent partagés avec la glutamylation (Gadadhar et al., 2017). L'idée est soutenue i) par le fait qu'une diminution du niveau de glycylation dans les cellules cillées soit souvent compensée par une augmentation de la glutamylation (Bosch Grau et al., 2017; Wloga et al., 2009) et ii) par le fait que les glycylasses appartiennent à la famille des TTLL, la même que les glutamylases. Trois glycylasses ont été rapportées à ce jour avec TTLL3, TTLL8 et TTLL10 qui montrent également des préférences réactionnelles *in vitro* (Tableau 4). Il est à noter que l'Homme présente une particularité : la TTLL10 est en effet inactive à cause de deux mutations ponctuelles dans le domaine TTL de l'enzyme (Rogowski et al., 2009). La glycylation chez l'Homme reste ainsi sous forme simple, par opposition à la souris chez qui TTLL10 est active et rallonge les chaînes (Bré et al., 1996). Les enzymes qui retirent la modification sont encore inconnues.

Fonctions. Le rôle biologique de la glycylation et son impact sur les microtubules restent largement méconnus. Il n'existe à ce jour aucun système permettant de générer *in vitro* des microtubules glycylysés d'une longueur contrôlée. La plupart des analyses sont réalisées par inactivation génique, qui ont néanmoins permis de révéler un rôle clé de la modification dans la stabilité des cils et flagelles. En effet, une forte réduction de l'expression de TTLL3 chez la drosophile mâle entraîne le désassemblage des axonemes (le cœur microtubulaire des flagelles qui dérive du centrosome) des spermatozoïdes, rendant les animaux infertiles (Rogowski et al., 2009). Plus récemment, la glycylation fut

rapportée pour également participer au battement des flagelles des spermatozoïdes. Leur déplacement devient anormal et circulaire en l'absence complète de glycylation par inactivation combinée des TLL3 et TLL8, rendant les souris mâles subfertiles (Gadadhar et al., 2021). Bien qu'aucune mutation n'ait encore été identifiée, il est possible qu'un défaut de glycylation puisse être responsable d'infertilités chez l'Homme. Enfin, la glycylation est également importante dans d'autres types de cellules ciliés. L'absence de TLL3 chez la souris provoque ainsi par exemple une disparition partielle des cils primaires des cellules épithéliales du colon, qui sensibilise les animaux au développement de tumeurs dans un modèle de carcinogénèse induit (Rocha et al., 2014). La glycylation de la tubuline pourrait ainsi présenter un intérêt dans le dépistage ou le traitement du cancer colorectal.

e. **Modifications post-traductionnelles peu étudiées :**

Bien qu'elles n'aient pas reçu autant d'attention, d'autres modifications post-traductionnelles ont été identifiées sur les tubulines (Janke and Magiera, 2020). En réalité, l'une des premières modifications ayant été identifiée fut la phosphorylation de la tubuline β (Eipper, 1972). Elle ne représente qu'une infime partie de la tubuline totale, mais fut rapportée pour empêcher l'incorporation des tubulines dans les microtubules de cellules HeLa (Fourest-Lieuvin et al., 2006). Dans les cellules neuronales, les tubulines β peuvent également être polyaminées sur leur glutamine 15 par des transglutaminases, qui favoriseraient la stabilité des microtubules (Song et al., 2013). Les tubulines α peuvent quant à elles être méthylées, ubiquitinylées, sumoylées ou encore palmytoylées (Janke and Magiera, 2020), mais leur importance respective demeure largement inconnue. Les systèmes enzymatiques qui régissent l'ensemble de ces modifications sont pour la plupart également peu étudiés ce qui, couplé au manque d'outils spécifiques permettant leur détection, est sûrement la raison pour laquelle leurs rôles restent encore obscurs.

3. **Les Microtubule-Associated Proteins (MAPs), modulation par le code tubuline :**

En plus de modifier intrinsèquement les propriétés des microtubules, les nombreux paramètres du code tubuline modulent également l'affinité ou l'activité des protéines effectrices, les MAPs. Depuis

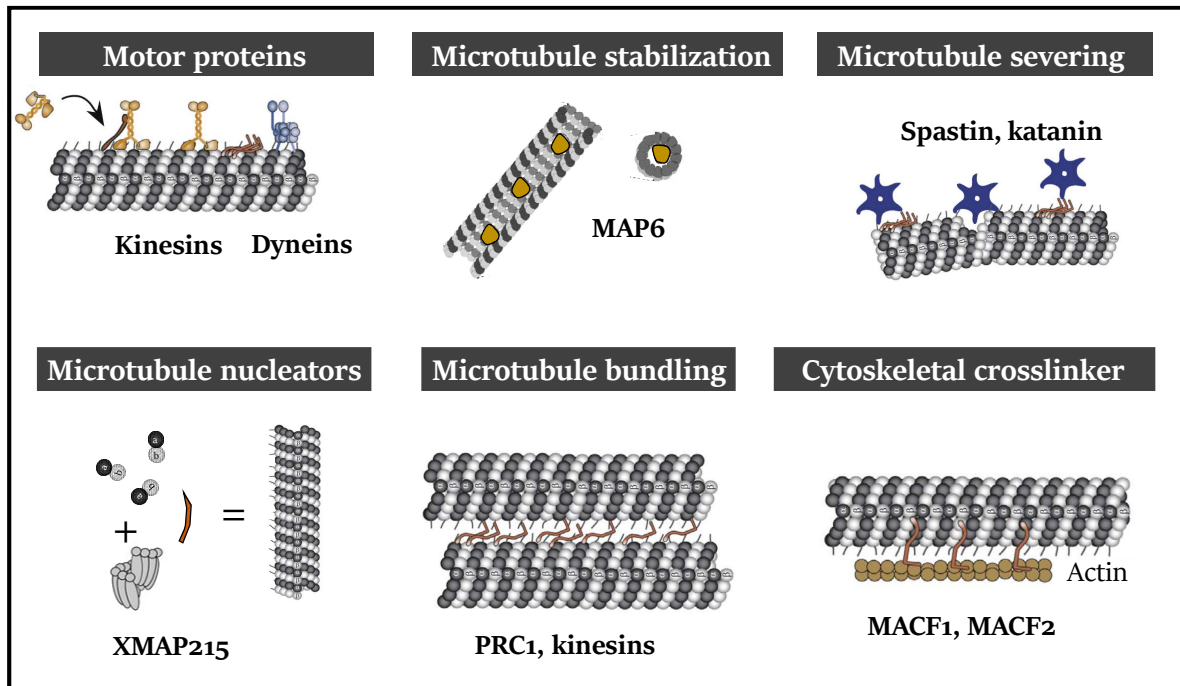


Figure 36 : Les protéines associées aux microtubules (MAPs). Plusieurs types de MAPs peuvent être répertoriés, avec i) les protéines motrices comme les kinésines; ii) les protéines stabilisant les microtubules comme MAP6 ; iii) les protéines qui, à l'inverse, les dépolymérisent comme la katanine ; iv) les protéines aidant à la nucléation comme XMAP215 ; v) les protéines pontant les microtubules entre eux comme pour certaines kinésines ou ; vi) des protéines pontant physiquement et/ou liant fonctionnellement les différents cytosquelettes, comme MACF1 avec l'actine. Adapté de Bodakuntla et al, 2019.

leur découverte dans les années 1970 (Sloboda et al., 1975), un grand nombre de MAPs ont été identifiées (Bodakuntla et al., 2019). Elles peuvent être regroupées en plusieurs catégories, avec notamment i) les protéines motrices, qui génèrent une force et qui sont capables de transporter des cargos cellulaires comme les kinésines (Richardson et al., 2005) ; ii) les protéines structurales qui stabilisent les microtubules à l'image de la protéine MAP6 (Cuveillier et al., 2021) ; iii) les protéines qui à l'inverse, déstabilisent les microtubules telle que la katanine (Sudo and Baas, 2010) ; iv) les protéines qui promeuvent la nucléation des microtubules comme XMAP215 (Thawani et al., 2018) ou v) les protéines capables de ponter les microtubules entre eux comme certaines kinésines (Leary et al., 2019), de ponter les microtubules avec l'actine ou encore les filaments intermédiaires comme MACF1 (Leung et al., 1999a, 1999b) (**Figure 36**). L'objectif ici n'est pas d'en dresser une liste exhaustive, ni de discuter de leurs fonctions dans les détails ; nous reviendrons plus tard sur certaines d'entre elles dans un chapitre consacré à la lignée plaquettaire. Nous noterons toutefois que la plupart des travaux réalisés sur les MAPs, dont ceux discutés jusqu'à maintenant avec la katanine, la spastine ou encore les protéines motrices, ne rapportent au mieux l'influence que d'un seul élément du code sur leurs fonctions. Les microtubules sont cependant beaucoup plus complexes, et constituent plutôt une mosaïque biochimique où cohabitent spatialement plusieurs isotypes et modifications post-traductionnelles différents. Bien que ce ne soit encore que peu étudié (Kaul et al., 2014), l'un des défis majeurs qui reste à relever est de comprendre l'impact combinatoire des différents éléments sur les fonctions des microtubules. Il est enfin important de noter que les MAPs n'interagissent pas qu'exclusivement avec les polymères. Elles peuvent en effet présenter des domaines de liaison à d'autres composants du cytosquelette, comme la famille des Formines, qui interagit également avec l'actine (Bartolini and Gundersen, 2010). Les MAPs permettraient ainsi de coordonner l'action des microtubules avec le reste de la machinerie cellulaire afin d'achever les différents processus vitaux dans lesquels ils sont impliqués (Dogterom and Koenderink, 2019).

C. Les microtubules et le code tubuline dans la lignée mégacaryocytaire :

L'essentiel des données présentées jusqu'ici se rapporte aux microtubules des neurones ou des cellules ciliées, où les différentes composantes du code tubuline ont été très étudiées. Les microtubules de la lignée mégacaryocytaire restent par comparaison très peu examinés. Ils impliquent toutefois de profonds remaniements exclusifs à ce type cellulaire, nécessaires notamment à i) l'élaboration des proplaquettes et ii) au maintien de la forme discoïde des plaquettes via la bande marginale, un anneau de microtubule sous-membranaire. Nous pensons par conséquent que les fonctions et le comportement des microtubules dans la lignée mégacaryocytaire est régie par un code tubuline qui lui est propre et que nous allons à présent aborder. Dans cette partie, nous récapitulerons premièrement les principales fonctions rapportées à ce jour qu'occupe le cytosquelette de microtubule dans la biogenèse et les fonctions hémostatiques des plaquettes. Nous discuterons ensuite des éléments du code tubuline qui y participent, avant de finir sur les tubulinopathies affectant le système plaquettaire. La majorité des points développés ci-après font l'objet d'une revue publiée récemment ([Kimmerlin et al., 2022b](#)).

1. L'organisation et les fonctions des microtubules :

a. Dans les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques :

Dans les cellules souches hématopoïétiques, qui donnent naissance à l'ensemble des lignées sanguines dont les mégacaryocytes et les plaquettes, l'importance des microtubules reste aujourd'hui largement inexplorée. Dans ces cellules souches, ils rayonnent à partir du centrosome, et ont dernièrement été rapportés pour participer à leur engagement dans la lignée myéloïde. Les microtubules contrôleraient notamment la structure de leur enveloppe nucléaire, influençant l'état de la chromatine sous-jacente et permettant l'expression de gènes qui pourraient être impliqués dans la mégacaryopoïèse ([Biedzinski et al., 2020](#)). Dans les progéniteurs engagés dans la voie mégacaryocytaire, les microtubules ne sont là-encore que très peu étudiés. L'essentiel des données aujourd'hui disponibles sur le rôle des microtubules dans le processus de formation des plaquettes est ainsi concentré sur les mégacaryocytes matures, particulièrement aux étapes de thrombopoïèse, ainsi que sur les plaquettes.

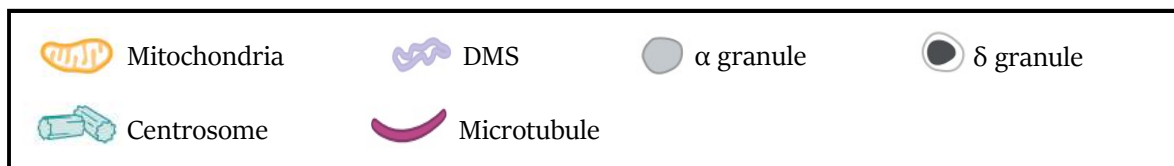
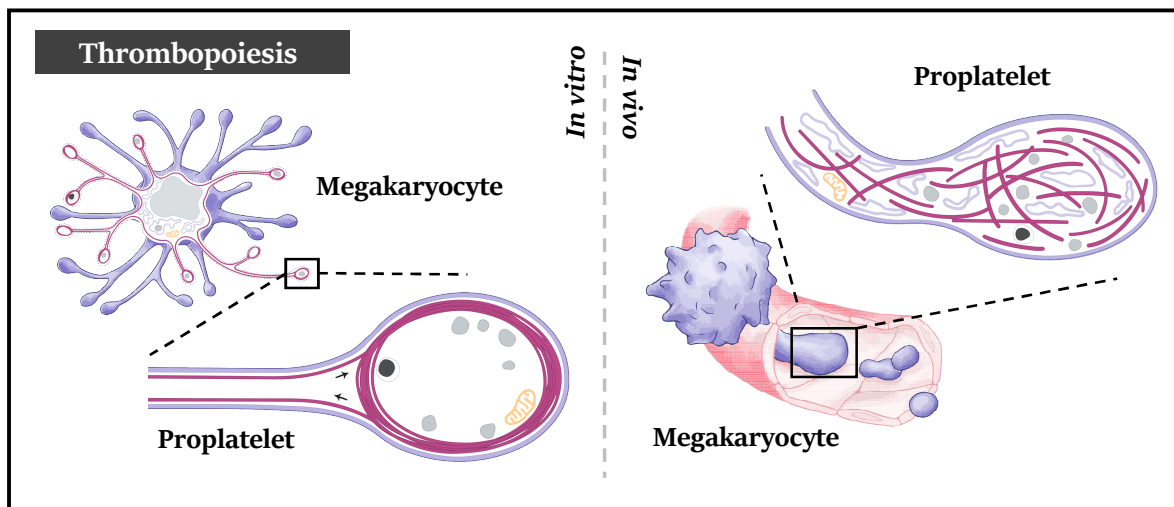
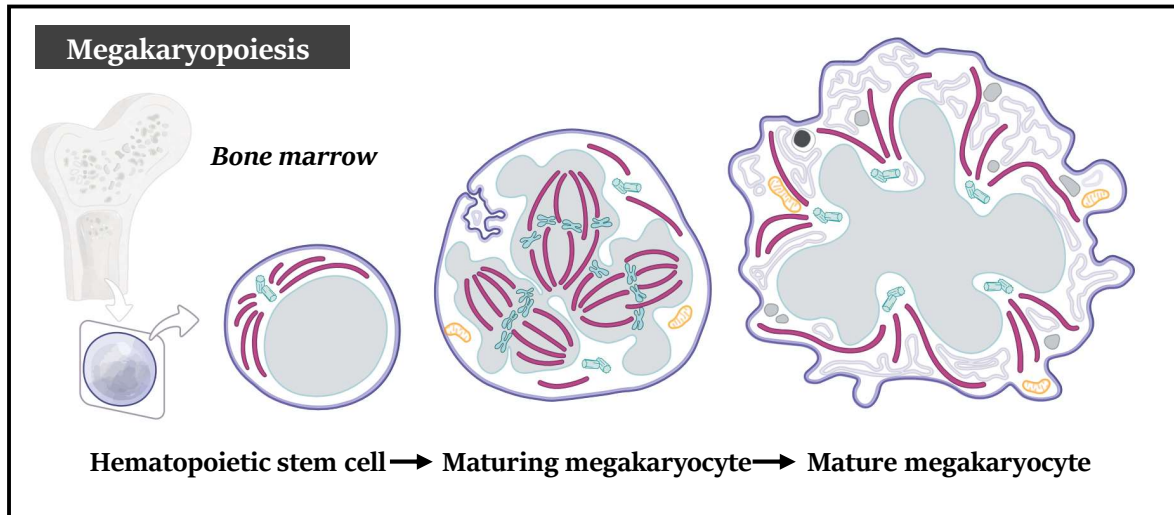


Figure 37 : L'organisation des microtubules dans les mégacaryocytes. (Haut) Pendant la mégacaryopoïèse, les microtubules constituent les faisceaux mitotiques lors des cycles d'endomitose. Dans les mégacaryocytes matures, ils proviennent des centrosomes péri-nucléaires. (Bas, gauche) Pendant la thrombopoïèse *in vitro*, les microtubules migrent dans l'espace sous-membranaire de la cellule. Ils forment des faisceaux compacts, qui pénètrent et allongent les proplaquettes par un mécanisme de coulisse dépendant de la dynéine. Les faisceaux se réorganisent à l'extrémité des proplaquettes de culture pour former une structure annulaire semblable à la bande marginale. (Bas, droite) Par opposition, pendant la thrombopoïèse *in vivo*, les microtubules des proplaquettes ne s'organisent pas en faisceaux, ne permettent pas l'élongation des proplaquettes (bien qu'ils servent de soutien structurel) et n'établissent pas une architecture circulaire à leur extrémité. Dessins réalisés par Tatjana Hirschmugl.

b. Dans les mégacaryocytes :

Les microtubules des mégacaryocytes furent pour la première fois documentés dans les années 1960 à partir d'observations réalisées par microscopie électronique à transmission sur des coupes de moelle (Behnke, 1969). Il faut cependant attendre les années 1990 et la découverte de la thrombopoïétine (Hitchcock and Kaushansky, 2014), avant de réellement pouvoir évaluer leur importance fonctionnelle. La cytokine permet le développement de systèmes de culture permettant de suivre la différenciation des mégacaryocytes et de les mettre à disposition pour des études mécanistiques (Debili et al., 1995). Les agents dépolymérisants tels que la colchicine ont alors été rapportés pour bloquer l'émission des proplaquettes *in vitro* (Handagama et al., 1987; Tablin et al., 1990). Les observations furent plus tard étayées chez les rats, qui développent une thrombopénie suite à l'injection de vincristine et dont les mégacaryocytes de la moelle semblent couverts de renflements évoquant des vestiges de proplaquettes (Stenberg et al., 1995). La plupart des données fonctionnelles dont nous disposons au sujet des microtubules dans la mégacaryopoïèse provient d'observations réalisées en systèmes de culture murins (et humains, dans une moindre mesure). Par microscopie intravitale, toutefois, la vincristine a récemment été décrite pour entraîner la rétraction des proplaquettes *in vivo*, révélant que les microtubules ont un rôle structurel de soutien dans les proplaquettes produites *in vivo* (Bornert et al., 2021). Les données pointent ainsi vers un rôle crucial des microtubules dans la biogenèse des plaquettes, notamment dans les étapes terminales qui sont aujourd'hui les mieux caractérisées.

Très peu de données sont aujourd'hui disponibles quant aux rôles des microtubules dans les étapes précoces de différenciation des mégacaryocytes, malgré la place pourtant centrale du cytosquelette notamment dans le processus d'endomitose. Nous reviendrons sur le sujet lorsque nous parlerons des MAPs dans la lignée plaquettaire. Dans les mégacaryocytes matures, les microtubules émanent des nombreux centrosomes (issus de l'endomitose) et rayonnent vers la périphérie cellulaire (Figure 37). Juste avant l'émission de proplaquettes, les microtubules se relocalisent dans l'espace cortical sous-membranaire du mégacaryocyte où ils s'assemblent de façon acentrosomale. Ils forment alors des faisceaux compacts qui pénètrent et allongent les proplaquettes par un mécanisme de coulisse dépendant de la protéine motrice dynéine (Bender et al., 2015; Patel et al., 2005). Les faisceaux se

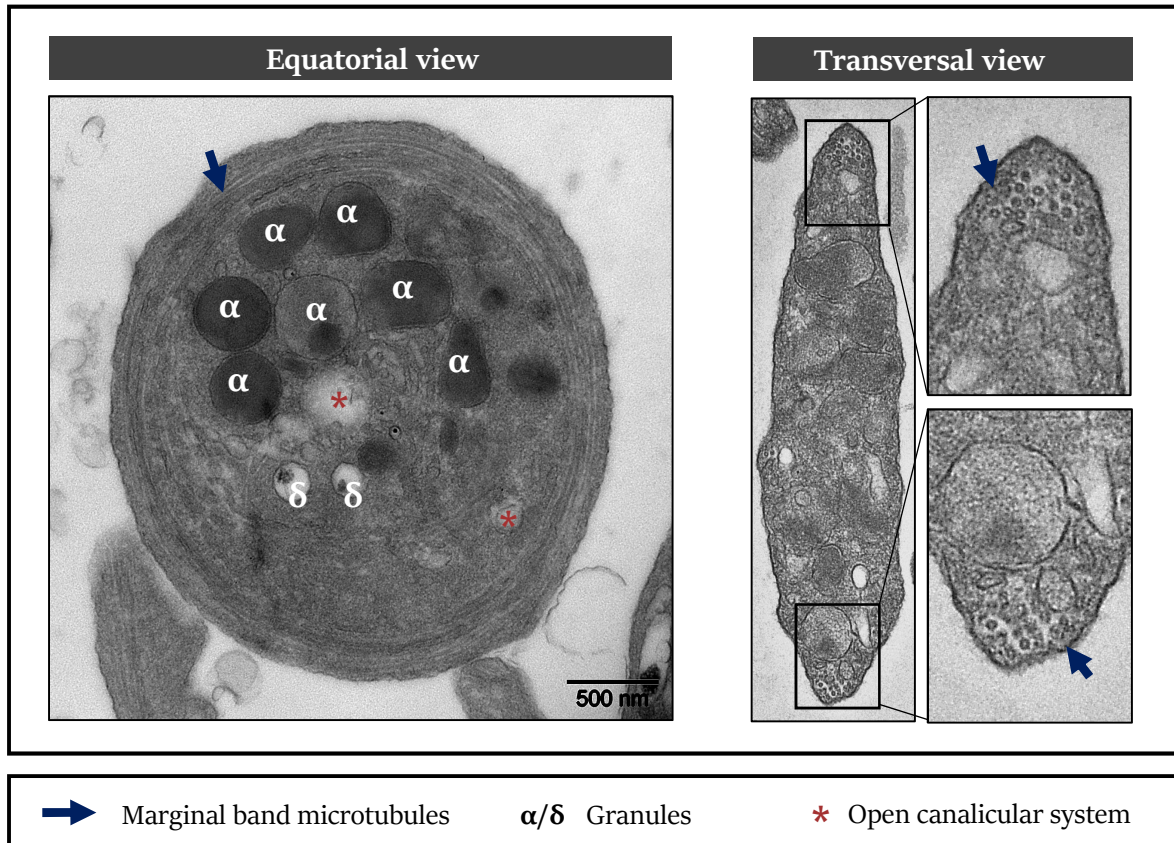


Figure 38 : Les microtubules des plaquettes sanguines. Les microtubules établissent une structure sous-membranaire dans les plaquettes appelée bande marginale. Elle prend la forme d'un véritable anneau constitué de plusieurs microtubules, illustré par microscopie électronique à transmission en (gauche) coupe équatoriale et (droite) en coupe transversale, où il est possible de distinguer jusqu'à 15 enroulements. Images réalisées par Anita Eckly (EFS Grand-Est, UMR_S1255).

réorganisent à l'extrémité des proplaquettes pour former une structure annulaire comparable à une bande marginale (Italiano et al., 1999). Pour rappel, cette observation a conduit à proposer un modèle où les plaquettes seraient continuellement produites et relarguées depuis l'extrémité des proplaquettes dans la circulation sanguine. Les travaux récents par microscopie intravitale chez la souris, que nous avons abordés dans la première partie, remettent cependant le modèle en question. En effet *in vivo*, i) les microtubules des proplaquettes ne s'organisent pas en faisceaux et ne forment pas de structures circulaires (Figure 37) (Bornert et al., 2021; Brown et al., 2018) ; ii) les microtubules ne participent pas à leur élongation mais assurent plutôt un soutien structurel; et iii) les proplaquettes sont relarguées entières dans la circulation, où elles seront alors segmentées en plaquettes dans la microcirculation pulmonaire par un mécanisme impliquant les microtubules et la formation d'intermédiaires proplaquettaires en forme d'haltères (Junt et al., 2007; Lefrançois et al., 2017; Thon et al., 2012). Au final et ce, quels que soient les processus considérés, *in vitro* ou *in vivo*, les données mettent en avant un rôle essentiel des microtubules dans la formation des plaquettes. Les mécanismes précis mis en place *in vivo* restent cependant à préciser.

c. Dans les plaquettes au repos :

La bande marginale. Peu après l'introduction du glutaraldéhyde dans les protocoles de microscopie électronique, ceux-ci furent appliqués aux plaquettes sanguines. Ils révélèrent une structure sous-membranaire de microtubule, unique chez les mammifères, la bande marginale (Behnke, 1965), dont le rôle est d'assurer le maintien de leur forme discoïde si caractéristique (Figure 38) (White and Rao, 1998). En effet, dépolymériser les microtubules conduit à une sphérocytose plaquettaire, c'est-à-dire qu'elles perdent cette forme discoïde au profit d'une apparence ovoïde voire sphérique. D'un point de vue ultrastructurel, la bande marginale se présente comme un véritable anneau qui se compose d'un faisceau compact de plusieurs microtubules suivant le contour interne des plaquettes, et qui peut détenir jusqu'à 60% de la tubuline plaquettaire totale (Steiner and Ikeda, 1979). Initialement, il était admis que la bande marginale était composée d'un seul et unique microtubule surenroulé de 10 à 15 fois. Il était en effet courant d'observer deux extrémités de microtubules émergeant de la structure par microscopie électronique (Behnke and Zelander, 1967; Nachmias, 1980). Cette notion fut cependant remise en question sur l'observation de plaquettes exprimant les protéines

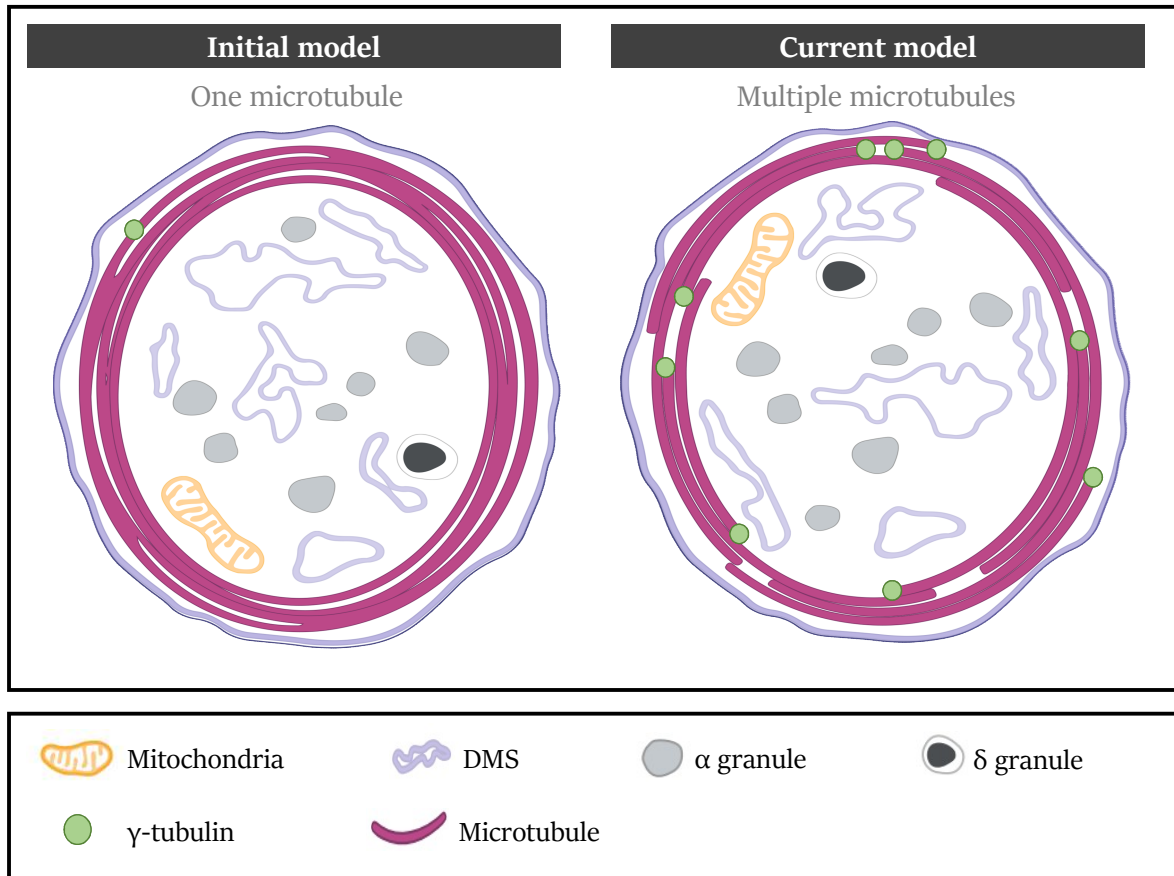
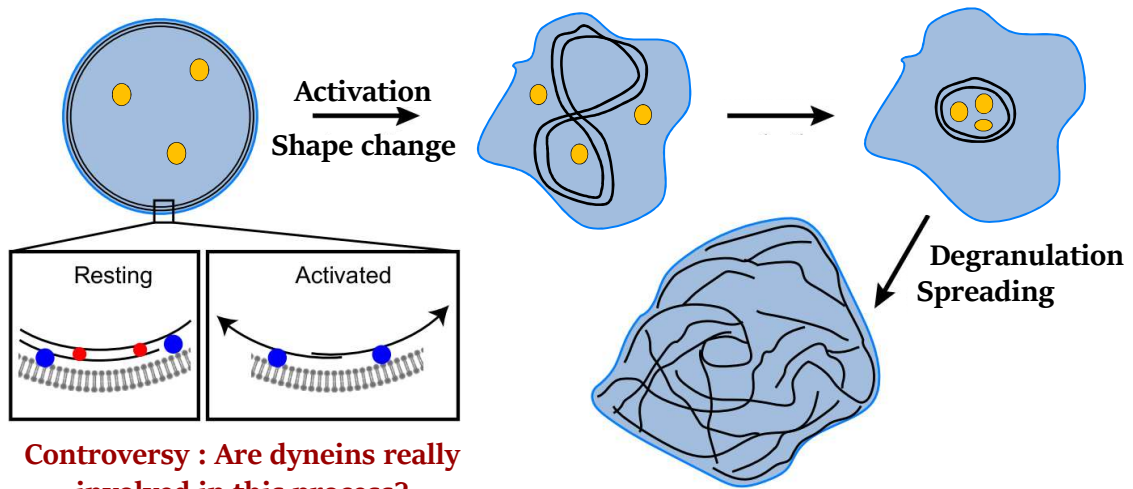


Figure 39 : La bande marginale. Représentation schématique d'une plaquette en coupe équatoriale selon (gauche) l'ancien modèle, où un seul microtubule surenroulé 10 à 15 fois constituait la bande marginale et selon (droite) le modèle actuel, où plusieurs microtubules indépendants constituent cette structure. Dessins réalisés par Tatjana Hirschmugl.

EB3-GFP (indiquant l'extrémité positive des microtubules) ou marquées pour la tubuline γ (indiquant l'extrémité négative). Il fut montré que la bande marginale contenait en fait au moins 7 à 12 microtubules indépendants de polarité mixte (**Figure 39**) (Patel-Hett et al., 2008). Plus récemment par microscopie corrélative à super-résolution, ce nombre a été revu à la hausse avec 24 microtubules en moyenne par bande marginale (Mathur et al., 2017). Il est important de noter l'absence de centrosome dans les plaquettes, posant alors la question du mode de nucléation des microtubules dans la cellule. La tubuline γ est toutefois bien présente. Il est ainsi fort probable que le cytosquelette de microtubules des plaquettes utilise un mode d'assemblage indépendant des centres organisateurs classiques. Étant donné la forte concentration en tubuline dans les plaquettes ($>150 \mu\text{M}$ d'après nos estimations, soit 5 à 10 fois supérieure à celle couramment rapportée pour des lignées cellulaires), il est possible qu'elle puisse à elle seule favoriser la nucléation des microtubules. En effet, *in vitro* au-delà d'une certaine concentration ($\approx 20 \mu\text{M}$), les tubulines purifiées s'assemblent spontanément en l'absence de tout centre organisateur (Roostalu and Surrey, 2017).

Permettre la courbure des microtubules. Les microtubules sont des polymères rigides ayant une longueur de persistance (distance en dessous de laquelle le microtubule se comporte comme une tige inflexible) estimée à 5.2 mm, qui dépasse très largement le diamètre normal des plaquettes (Gittes et al., 1993). Les microtubules des plaquettes réussissent malgré tout à se courber (sans pour autant se rompre), posant la question des facteurs qui contribuent à cette particularité. Il fut assez tôt montré que l'intégrité de la bande marginale est conservée après une lyse des plaquettes, et ceci même en l'absence d'agents fixateurs (Behnke and Zelander, 1967; Kenney and Linck, 1985; Nachmias, 1980). Dans de telles conditions, l'intégrité de la structure n'est en réalité perdue qu'en réponse à des concentrations croissantes de chlorure de sodium ou en réponse à la trypsine (mais pas à la DNase I) (Kowitz et al., 1988). Il semble que la bande marginale ne soit ainsi pas simplement le résultat des contraintes spatiales imposées par les dimensions et la géométrie plaquettaire, et qu'un ou plusieurs facteurs protéiques (différents de l'actine) participent à son maintien (Vallee and Borisy, 1977). L'hypothèse paraît confortée par la visualisation de petits ponts en microscopie électronique entre microtubules adjacents de la bande marginale (Boyles et al., 1985; Nakata and Hirokawa, 1987). Il est à noter que l'organisation des microtubules de la bande marginale n'est pas sans rappeler celle

Marginal band twisting and centralization : actomyosin-dependent mechanism



Controversy : Are dyneins really involved in this process?

Karin Sadoul, 2015

● Dyneins ● Kinesins ● Granules — Microtubules

Figure 40 : La réorganisation de la bande marginale lors de l'activation plaquettaire. En réponse à une activation, la plaquette perd sa forme discoïde. La bande marginale se déforme puis se replie sur elle-même sous l'action contractile du cytosquelette d'actomyosine. Elle donne alors naissance à un plus petit anneau central de microtubules qui finira par disparaître, laissant place à un réseau de polymère désorganisé. Image adaptée de Thomas, 2019.

retrouvée dans les terminaisons présynaptiques des jonctions neuromusculaires chez la *Drosophile* (Bodaleo and Gonzalez-Billault, 2016). Les microtubules n’y forment cependant pas de véritable anneau, mais plutôt une structure en forme de crochet qui requiert la présence d’un homologue de MAP1B pour se maintenir (Roos et al., 2000). Par analogie, il est par conséquent fort probable qu’une (ou plusieurs) MAP(s) plaquettaires, d’identité(s) encore inconnue(s), orchestre(nt) effectivement l’architecture unique de la bande marginale. Les candidats en tête de liste sont les protéines motrices, kinésines ou dynéines, sur lesquelles nous reviendrons plus tard.

d. Dans les plaquettes activées :

Réorganisation de la bande marginale suite à l’activation plaquettaire. En réponse à un agoniste ou sur une matrice pro-thrombotique, l’activation des plaquettes s’accompagne de la perte de leur forme discoïde. Dans un premier temps, la bande marginale de microtubules se relaxe puis s’étend par un mécanisme qui dépendrait des protéines motrices dynéines. Elle se replie alors sur elle-même sous l’action des contraintes corticales exercées par le squelette d’actomyosine pour ensuite donner naissance à un petit anneau central qui entoure les granules α et δ avant leur exocytose (Figure 40) (Diagouraga et al., 2014). Lorsque les plaquettes s’étalent, l’anneau disparaît au profit de microtubules désorganisés. Les mécanismes contrôlant cette réorganisation restent encore mal caractérisés, et sont parfois même controversés. En particulier, une étude récente réalisée par vidéo-microscopie optique en temps réel sur des plaquettes individuelles non fixées suggère que l’étape initiale d’élongation de la bande marginale n’aurait en réalité pas lieu (Mathur et al., 2018), évoquant plutôt un biais expérimental de l’étude princeps (Diagouraga et al., 2014), basée sur des échantillons fixés. Les étapes suivantes de repliement et de réorganisation de la bande marginale restent dans tous les cas très dépendantes de la contraction du squelette d’actomyosine cortical (Ge et al., 2012). En effet, dépolymériser l’actine et inhiber la myosine IIA bloque la centralisation des granules plaquettaires ainsi que le remodelage de la bande marginale, qui reste alors intègre (Diagouraga et al., 2014; Severin et al., 2013).

Rôle des microtubules dans l’activation plaquettaire. Leur importance fonctionnelle fut évaluée dès les années 1970, notamment à l’aide d’agents dépolymérisant des microtubules. En particulier,

la vincristine fut rapportée pour inhiber l'agrégation et la sécrétion des plaquettes *in vitro*, présentant ainsi un rôle important des microtubules dans le processus d'exocytose des granules (White, 1969). Les résultats ne firent toutefois pas l'unanimité, et furent plus tard invalidés (Kuntamukkula et al., 1982). De manière intéressante, le taxol prévient la dépolymérisation des microtubules et de la bande marginale par la vincristine, et permet aux plaquettes de conserver leur forme discoïde. Il ne permet toutefois pas de rétablir une réponse plaquettaire normale, indiquant que la vincristine semble exercer ses effets délétères indépendamment des microtubules (White and Rao, 1982). Il est à noter que les différents agents utilisés pour dépolymériser les microtubules furent rapportés pour provoquer la lyse des plaquettes *ex vivo* (White, 1968). Bien que la suite d'évènements conduisant à ce phénomène soit encore inconnue, il est possible qu'elle soit responsable des effets délétères observés en agrégation plaquettaire. Plus récemment, le développement d'une lignée de souris inactivée pour l'isotype de tubuline β_1 exclut davantage l'éventualité d'un rôle majeur des microtubules et de la bande marginale dans la réponse plaquettaire (Italiano et al., 2003). En effet, leurs plaquettes présentent une bande marginale anormale, formée par seulement 3-5 enroulements, ne sont plus discoïdes mais ovoïdes, mais agrègent normalement *in vitro*. Les souris présentent toutefois une réponse diminuée dans un modèle de thrombose artérielle induit au chlorure de fer, qui fut cependant attribuée à leur plus faible numération plaquettaire plutôt qu'à un défaut fonctionnel. Les auteurs conclurent alors que les rôles des microtubules, de la bande marginale et de la forme discoïde des plaquettes dans leurs fonctions et dans l'hémostase étaient probablement mineurs. L'un des travaux présentés dans cette thèse viendra nuancer cette conclusion, présentant des arguments en faveur d'un rôle majeur de la forme discoïde, et donc des microtubules de la bande marginale spécifiquement, dans l'hémostase.

2. Le code tubuline dans la lignée plaquettaire :

Les microtubules et le code tubuline restent globalement peu étudiés dans la lignée plaquettaire. L'essentiel du savoir se rapporte à leur biogenèse plutôt qu'à leurs fonctions où les microtubules restent peu explorés par manque d'arguments forts en faveur de leur rôle fonctionnel.

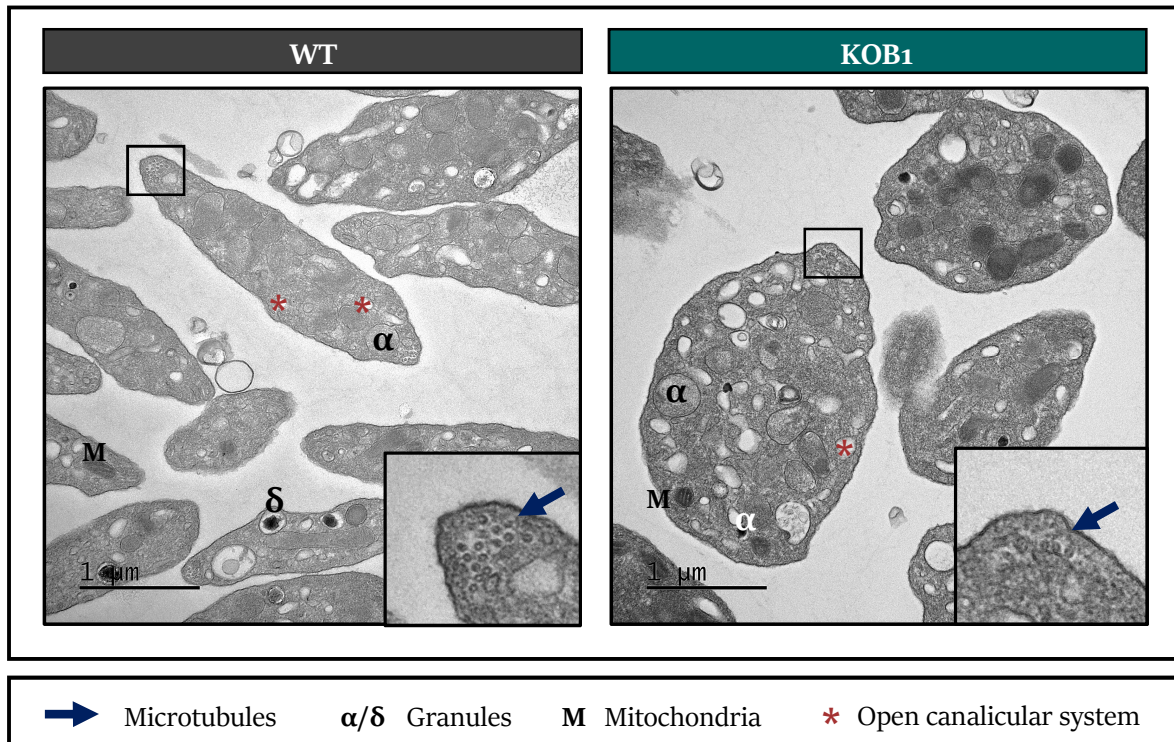


Figure 41 : Perte de la forme discoïde pour une morphologie ovoïde en l'absence de tubuline $\beta 1$. Image représentative par microscopie électronique à transmission de plaquettes contrôles (gauche) et inactivées pour l'isotype de tubuline $\beta 1$ (droite) en coupe transversale. Les encarts du coin inférieur droit de chaque image montrent un grossissement de leur bande marginale. Images réalisées par Anita Eckly (EFS Grand-Est, UMR_S1255).

a. Les isotypes de tubuline dans la lignée plaquettaire :

Les isotypes de tubuline β . Le premier élément du code tubuline ayant retenu l'attention fut la tubuline β_1 , l'isotype le plus divergent de la famille des tubulines β . Elle fut identifiée en 1986 par criblage d'une banque d'ADNc élaborée à partir de moelle osseuse de souris (Wang et al., 1986). L'expression de cet isotype sera par la suite rapportée pour être restreinte et exclusive à la lignée mégacaryocytaire, sous la dépendance de facteurs de transcription spécifiques à l'image de NF-E2 (Lecine et al., 2000; Wang et al., 1986). Dans la littérature, il est classiquement rapporté que la tubuline β_1 représente 90% de la tubuline β totale des plaquettes (Lewis et al., 1987). La proportion fut estimée par Western Blot, une méthode toutefois peu quantitative, et ne fut par la suite jamais confirmée indépendamment. Une étude protéomique plus récente et réalisée par spectrométrie de masse, plus fiable sur le plan quantitatif, estima cette valeur aux alentours de 50% de la tubuline β totale (Burkhart et al., 2012). La valeur reste malgré tout élevée, en accord avec le rôle fonctionnel majeur de l'isotype β_1 dans la lignée plaquettaire. En effet, les souris inactivées ainsi que les patients porteurs de mutations dans le gène codant cet isotype montrent une thrombopénie modérée (d'environ 50%) associée à une nette augmentation du volume plaquettaire (macrothrombopénie) (Burley et al., 2018; Schwer et al., 2001). Dans ces souris et pour certains patients, une inefficacité des mégacaryocytes à étendre des proplaquettes *in vitro* fut observée, représentant ainsi une cause possible de la thrombopénie. La hausse du volume plaquettaire est quant à elle une conséquence directe d'un défaut de formation de la bande marginale, qui ne se compose alors plus que de 3 à 5 enroulements, rendant par conséquent les plaquettes ovoïdes (Figure 41). Elle ne s'accompagne cependant pas de défauts fonctionnels, comme nous avons pu l'aborder précédemment, faisant de l'isotype β_1 un élément essentiel pour la formation, mais pas pour les fonctions plaquettaires ni l'hémostase. De manière intéressante, les plaquettes inactivées pour la tubuline β_1 surexpriment d'autres isotypes de tubuline β (Schwer et al., 2001), qui pourraient par compensation maintenir un niveau de tubuline totale suffisant dans la cellule. Les mécanismes permettant cette compensation ne sont toutefois pas connus. Ils semblent indépendants du mécanisme d'auto-régulation de la tubuline abordé précédemment, car les niveaux d'ARN messagers de chaque isotype restent normaux dans les mégacaryocytes déficients par rapport aux contrôles (Schwer et al., 2001). Il reste à noter que la tubuline β_1 , bien qu'elle soit rapportée pour être exclusive au système plaquettaire, est en

réalité aussi détectée dans la thyroïde (Stoupa et al., 2018). Le niveau d'expression reste bien plus faible que dans les plaquettes, ce qui ne l'empêche pas d'être impliquée dans la formation de cette glande. En effet, des mutations ponctuelles dans le gène *TUBB1* chez l'Homme peuvent entraîner une hypothyroïdie congénitale par dysgénésie thyroïdienne, en plus des défauts plaquettaires déjà rapportés.

Les isotypes de tubuline α . Le répertoire d'expression des tubulines α ainsi que leurs potentielles implications dans les mégacaryocytes et les plaquettes étaient encore inconnus à mon arrivée au laboratoire. Les travaux présentés dans cette thèse adresseront cette lacune en identifiant deux isotypes α de tubuline, à savoir $\alpha4A$ et $\alpha8$, comme étant impliqués dans la biologie plaquettaire.

b. Modifications post-traductionnelles de tubuline dans la lignée plaquettaire :

L'acétylation, la détyrosination et la polyglutamylation de la tubuline ont déjà été détectées dans la lignée plaquettaire (van Dijk et al., 2018; Gundersen and Bulinski, 1986; Patel-Hett et al., 2008). Nous ne connaissons cependant pas, ni leur cinétique d'apparition au cours de la mégacaryopoïèse, ni leurs proportions relatives dans les mégacaryocytes et plaquettes, ni leurs rôles qui restent pour beaucoup encore hypothétiques. L'une des explications rendant compte de cette méconnaissance serait i) l'absence de modèles cellulaires ou d'animaux transgéniques adaptés à l'étude plaquettaire, et ii) un manque d'outils spécifiques permettant leur détection tels que des anticorps, qui sont limités surtout dans les cas de la glutamylation et de la glycylation car ils ne détectent pas tous les types de chaînes latérales.

L'acétylation $K40$ des tubulines α . Elle fut la première à retenir l'attention grâce au Panobinostat, un inhibiteur à large spectre des désacétylases HDAC. Le composé fut en effet rapporté pour entraîner une thrombopénie chez l'Homme et pour perturber la mégacaryopoïèse ainsi que l'émission de proplaquette par des mégacaryocytes de culture humains (Ellis et al., 2008; Iancu-Rubin et al., 2012). L'ensemble des effets délétères de l'inhibiteur était initialement attribué à l'enzyme HDAC6, ainsi qu'à l'hyperacétylation des tubulines qui en résultait. L'hypothèse fut d'ailleurs confortée ultérieurement par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la désacétylase HDAC6 (Messaoudi et al., 2017).

Elle fut toutefois réexaminée suite à l'expression d'une forme non-acétylable de tubuline α dans les mégacaryocytes humains de culture. En particulier, bien qu'elle empêche l'hyperacétylation des tubulines lorsque HDAC6 est inhibée, elle ne permet cependant pas de rétablir une mégacaryopoïèse normale, indiquant que les défauts observés sont indépendants des microtubules (Messaoudi et al., 2017). Il fut en effet montré que les défauts provoqués par l'inhibition d'HDAC6 étaient en réalité causés par l'hyperacétylation d'une seconde cible de l'enzyme, la cortactine, qui s'avère nécessaire pour la formation des plaquettes chez l'Homme (Messaoudi et al., 2017). Nous précisons ici que la cortactine n'est pas requise pour le processus chez la souris, expliquant probablement pourquoi la lignée de souris déficiente pour HDAC6 ne manifeste aucun défaut de biogenèse plaquettaire (Ribba et al., 2021). Les fonctions plaquettaires telles que l'agrégation sont dans l'ensemble in affectées, bien qu'un léger avantage cinétique dans l'étalement des plaquettes déficientes sur une surface de verre fut observé (Sadoul et al., 2012). De manière similaire, les souris inactivées pour l'acétylase α TAT1 montrent également des paramètres plaquettaires normaux, et ce malgré l'absence presque totale de tubuline acétylée (Ribba et al., 2021). L'acétylation de la tubuline ne semble ainsi pas importante, ni dans la biogenèse ni dans les fonctions plaquettaires. Les résultats sont inattendus au regard du rôle de cette modification dans la résistance au stress mécanique des microtubules (Portran et al., 2017), qui aurait pu contribuer aux courbures extrêmes de la bande marginale.

La détyrosination des tubulines α . Peu de données existent à ce jour dans la lignée plaquettaire. La modification étant capable de moduler la liaison et l'activité des protéines motrices (Dunn et al., 2008; McKenney et al., 2016; Nirschl et al., 2016), il est envisageable qu'elle soit impliquée dans la formation de la bande marginale. En effet, et comme nous le verrons plus tard, les protéines motrices sont aujourd'hui les meilleurs candidats parmi les MAPs pour l'assemblage de la bande marginale. L'hypothèse n'a toutefois pas encore été évaluée, mais l'arrivée récente de souris déficientes pour la protéine SVBP (essentielle à l'activité du complexe détyrosinase) permettra sans doute de répondre à la question (Pagnamenta et al., 2019). En ce qui concerne la tyrosinase TTL, une inactivation tissu-spécifique dans la lignée mégacaryocytaire sera nécessaire car cette délétion est létale si généralisée à l'organisme entier (Erck et al., 2005).

La glutamylation. Elle fut récemment rapportée pour participer à la formation d'éléments proplaquettaires *in vitro* (van Dijk et al., 2018). L'étude ne permet cependant pas de conclure avec certitude sur l'importance fonctionnelle de cette modification dans la mégacaryopoïèse. En effet, elle fut réalisée dans une lignée CHO exprimant une intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ constitutivement active, qui permet à son tour d'exprimer l'isotype de tubuline β_1 et d'étendre des protrusions cytoplasmiques s'apparentant à des proplaquettes. Le modèle cellulaire reste malgré tout fondamentalement différent des mégacaryocytes (de culture) car i) les microtubules observés dans les protrusions des CHO ne s'organisent pas en faisceaux compacts ; ii) les microtubules ne bouclent que rarement à l'extrémité des protrusions CHO et iii) ce modèle n'a pas été décrit pour être capable de libérer des fragments cytoplasmiques de type plaquettaire. Nous retiendrons toutefois que la glutamylase TTLL5 (qui assure l'initiation des chaînes sur les tubulines α) est nécessaire à la formation des protrusions dans leur modèle, une donnée qui nécessitera d'être confirmée dans la lignée mégacaryocytaire. Dans une seconde étude, des souris déficientes pour la déglutamylase CCP6 ont été générées. Elles présentent une augmentation de la numération plaquettaire ainsi que du nombre de mégacaryocytes (de faible ploïdie) dans la moelle, suggérant qu'une hyperglutamylation des microtubules puisse avoir un effet positif sur la production de plaquettes (Ye et al., 2014). L'hypothèse fut cependant écartée au profit d'un mécanisme impliquant Mad2, un régulateur de la mitose qui peut également être déglutamylé par CCP6. Il est à noter que la réactivité plaquettaire est également diminuée chez ces souris qui présentent une légère tendance au saignement. Dans l'ensemble, rien de très solide n'a encore été rapporté sur le rôle fonctionnel de la glutamylation dans la lignée plaquettaire, pour lequel la question reste entièrement ouverte. Pour l'aborder, il sera nécessaire d'avoir une idée plus précise du programme transcriptionnel des différentes enzymes contrôlant la glutamylation. De plus, il faudra très probablement envisager l'inactivation simultanée de plusieurs enzymes compte tenu de la nature compensatoire des enzymes impliquées.

La glycylation. Pourtant uniquement observée jusqu'ici dans les cellules ciliées et les flagelles, la polyglycylation fut récemment détectée par Western Blot dans des lysats de mégacaryocytes humains différenciés à partir de cellules souches pluripotentes induites (Khan et al., 2022). La modification est par contre absente dans les plaquettes circulantes, posant alors la question de son rôle

MAP	In mice (knockout)		In humans (mutations)	
	Phenotype	Platelet biogenesis	Platelet functions	Phenotype
Category : Motor proteins				
KIF5b	Normal platelet counts Normal platelet volumes Reduced platelet functions	Not involved	Reduced granule secretion and aggregation in response to low doses of agonists	Unknown
Unknown kinesins	Unknown	Responsible for granule transport into proplatelet in vitro and possibly involved in marginal band maintenance	Unknown	-
Dynein	Unknown	Responsible for proplatelet elongation in vitro	Involved in initial reorganization of the marginal band upon activation	Unknown
Category : Microtubule stability				
Stathmin	Thrombocytosis with age Unknown platelet volumes Unknown platelet functions	Increased bone marrow megakaryocytes	Unknown	Unknown
APC	Mild thrombocytosis Normal platelet volumes Normal platelet functions	Increased megakaryocyte polyploidization in vitro Increased proplatelet branching in vitro	Normal	Unknown
CLASP2	Severe thrombocytopenia Normal platelet volumes Normal platelet functions	Decreased megakaryocyte progenitor proliferation in vitro. Decreased megakaryocyte polyploidization in situ	Normal	Unknown
Category : Cytoskeletal crosslinker (physical or functional)				
mDia1	Macrothrombocytopenia Normal platelet functions	Reduced megakaryocyte polyploidization in situ Reduced proplatelet formation in vitro	Normal	Macrothrombocytopenia, increased microtubule coils in marginal band. No bleedings
MACF1	Normal platelet counts Normal platelet volumes Normal platelet functions	Not involved	Normal	Unknown
GEF-H1	Unknown	Decreased megakaryocyte polyploidization in vitro in shRNA megakaryocytes	Unknown	Unknown
Category : Microtubule nucleation				
RANBP10	Normal platelet counts Normal platelet volumes Reduced platelet functions	Marginal band disorganization and presence of ovoid platelets	Reduced granule secretion and aggregation in response to collagen and low doses of thrombin	Unknown
Category : Uncharacterized				
Nardylisin	Unknown	Involved in proplatelet release in vivo	Unknown	Unknown

Tableau 5: Principales MAPs ayant un rôle identifié dans la lignée plaquettaire. Pour chaque MAP, classée selon les catégories de la figure 36, le phénotype plaquettaire des souris déficientes, ainsi que les éventuels défauts de biogenèse et de fonctions des plaquettes rapportés sont indiqués. De même, le phénotype plaquettaire des patients porteurs de mutations dans le gène de chaque MAP, s'il existe, est indiqué.

dans la biogenèse des plaquettes. Il est important de noter que l'enzyme TTLL10, la seule à pouvoir rallonger les chaînes de glycine et donc réaliser la polyglycylation, fut initialement rapportée pour être inactive chez l'Homme (Rogowski et al., 2009). Les auteurs ayant rapporté la présence de cette modification dans les mégacaryocytes de culture humains ne discutent cependant pas cette donnée. La génération de lignées souris déficientes pour les glycylasses permettra sans doute de préciser ces observations et d'évaluer avec certitude l'importance fonctionnelle de la modification. Enfin, et mis à part la palmitoylation et la phosphorylation dont les fonctions exactes restent encore inconnues (Caron, 1997; Zahedi et al, 2008), aucune autre modification post-traductionnelle de la tubuline n'a été détectée dans la lignée plaquettaire à ce jour.

c. Les protéines associées aux microtubules dans la lignée plaquettaire :

Pour l'instant, seul un petit nombre de MAPs a été rapporté pour jouer un rôle dans la lignée plaquettaire. Le choix ici est de présenter celles qui paraissent les plus intéressantes, à commencer par les protéines motrices. Pour une liste plus exhaustive, nous nous référerons à notre revue récemment publiée (Tableau 5) (Kimmerlin et al., 2022b). Dans les mégacaryocytes de culture, la formation des proplaquettes fait appel à un mécanisme dynéine-dépendant permettant aux microtubules de coulisser les uns par rapport aux autres pour étendre la protrusion cytoplasmique (Bender et al., 2015). Ce processus, dont l'importance *in vivo* n'a pas encore été évaluée, est bloqué par des inhibiteurs spécifiques de la dynéine. Dans les mégacaryocytes de culture toujours, les protéines de type kinésines sont nécessaires au transport d'organelles dans les proplaquettes (Richardson et al., 2005). L'isoforme de kinésine impliquée est cependant inconnu. Les souris inactivées pour la kinésine-1 (Kif5b) présentent une numération, une forme et un contenu granulaire plaquettaire normaux, excluant donc un rôle de cet isoforme dans la formation des plaquettes (Adam et al., 2018). Les plaquettes déficientes pour cette kinésine-1 montrent toutefois une capacité moindre à dégranuler en réponse à des faibles doses d'agonistes, l'impliquant ainsi plutôt dans les fonctions plaquettaires. Enfin, il est intéressant de noter que l'acide aurintricarboxylique, un inhibiteur des kinésines, entraîne une diminution du diamètre de la bande marginale (Diagouraga et al., 2014). Bien qu'il ne soit pas strictement spécifique de ces protéines motrices, ces résultats suggèrent qu'une ou plusieurs kinésines (encore inconnues) pourraient participer à la formation ou au maintien de cette structure

par pontage de ses microtubules. L'hypothèse est d'autant plus probable que certaines kinésines, comme la kinésine-14, ont été rapportées pour pouvoir courber, voire boucler les microtubules sur eux-mêmes *in vitro* (Gittes et al., 1996; Mitra et al., 2020).

La deuxième classe de MAPs potentiellement importantes est celle ayant un effet stabilisant des microtubules. Elle pourrait être impliquée dans la maturation des mégacaryocytes qui n'a été que très peu abordée jusque-ici, un élément étonnant au regard de la place pourtant centrale des microtubules lors de l'endomitose. Dans les mégacaryocytes, nous avons vu que l'expression du facteur d'échange nucléique GEF-H1 doit être absolument réprimée pour permettre l'entrée de la cellule dans le cycle endomitotique *in vitro* (Gao et al., 2012). Il s'avère que l'activité de la protéine GEF-H1 est en réalité directement régulée par les microtubules : le facteur est entravé quand il leur est lié et ne devient actif qu'une fois relâché des polymères (Krendel et al., 2002). Par conséquent, si l'équilibre dynamique des microtubules était perturbé, il est possible que l'entrée des mégacaryocytes dans le cycle endomitotique puisse l'être également. L'hypothèse est en accord avec les résultats observés lorsque la nature instable des microtubules est exacerbée, soit i) par surexpression d'une version constitutivement active de la stathmine qui séquestre les dimères libres ; soit ii) suite à l'inactivation de la protéine pro-stabilisante CLASP2. Dans les deux cas, l'équilibre est rompu en faveur d'un état d'instabilité et la ploïdie des mégacaryocytes est alors réduite (Drabek et al., 2012; Iancu-Rubin et al., 2011). Les MAPs pourraient donc indirectement réguler le processus d'endomitose des mégacaryocytes. L'idée reste cependant hypothétique et des études supplémentaires seront nécessaire pour la démontrer. Il faudra toutefois être prudent, car une dépolymérisation totale du cytosquelette de microtubule par des agents dépolymérisants favorise à l'inverse le processus d'endomitose *in vitro* et *in vivo* (Baatout et al., 1998; Harris and Penington, 1984; van der Loo et al., 1993).

3. Les tubulinopathies plaquettaires :

Les tubulinopathies sont des pathologies causées par des mutations dans des gènes codant pour les tubulines α ou β (*TUBA1A*, *TUBA3E*, *TUBA8*, *TUBB2A*, *TUBB2B*, *TUBB3* ou *TUBB5*), qui se manifestent en général par des malformations cérébrales (Chakraborti et al., 2016). Elles touchent également le système plaquettaire, avec en tête de liste le gène *TUBB1*. Les mutations provoquent typiquement

Nucleotide change	Amino acid change	Exon	Rs ID	MAF	Phenotype	Incorporation into microtubules?
<i>α4A-tubulin</i>						
c.541G>A	p.Val181Met	4	rs757379335	0.000139	Macrothrombocytopenia and abnormal marginal band	-
c.547G>C	p.Gln183Gln		rs775824469	0.000008		
<i>α8-tubulin</i>						
c.59G>A	p.Cys20Tyr	2	-	-	Thrombocytopenia	No
c.202A>C	p.Ile68Leu	2	rs776983625	0.000068	Thrombocytopenia	No
c.640C>T	p.Arg214Cys	4	rs567804441	0.000171	In combination with the TUBB1 p.Gly146Arg mutation Macrothrombocytopenia with abnormal marginal band	Altered
c.727C>T	p.Arg243Cys	4	rs762265885	0.000072	Macrothrombocytopenia with abnormal marginal band	No
c.868G>A	p.Glu290Lys	4	rs754515296	0.000036	Macrothrombocytopenia with abnormal marginal band	Altered
c.958C>T	p.Arg320Trp	4	rs140202346	0.00019*	Thrombocytopenia	No
<i>β1-tubulin</i>						
c.35delG	p.Cys12Leufs*12	1	rs773248042	0.000032	Macrothrombocytopenia and hypothyroidism	-
c.58-2A>G	-	-	rs1361708566	0.000008	Thrombocytopenia	-
c.128_129delAGinsCC	p.Gln43Pro	2	-	-	Increased prevalence in patients with macrothrombocytopenia Decreased risks of cardiovascular disease in men Increased risks of intracerebral hemorrhages in men	Altered
c.185G>A	p.Arg52Gln	3	rs749343000	0.000004	Macrothrombocytopenia and mild bleeding disorders	-
c.318C>G	p.Tyr106*	4	rs560702757	0.000004	Macroplatelets and Hypothyroidism	-
c.319A>C	p.Thr107Pro	4	rs7320793894	0.000048	Macrothrombocytopenia	No
c.326G>A	p.Gly109Glu	4	rs41302899	0.000871	Macrothrombocytopenia	No
c.436G>A	p.Gly146Arg	4	rs371821215	0.000036	Macrothrombocytopenia	-
c.445A>C	p.Thr149Pro	4	-	-	Thrombocytopenia Genomic instability	No
c.479C>T	p.Pro160Leu	4	rs759117911	0.000004	Macroplatelets and hypothyroidism	No
c.721C>T	p.Arg241Trp	4	rs368923302	0.000091	Thrombocytopenia and mild bleeding disorders	-
c.726C>G	p.Phe242Leu	4	rs890185415	0.000032**	In combination with the TPM4 p.Ala83Val mutation : Thrombocytopenia associated with mild bleeding disorders	-
c.752G>A	p.Arg251His	4	rs770226644	0.00003***	Thrombocytopenia and genomic instability	No
c.779T>C	p.Phe260Ser	4	rs105757996	0.0022****	Macrothrombocytopenia	No
c.806G>A	p.Gly269Asp	4	rs1293743818	0.000004	Macrothrombocytopenia with abnormal marginal band	No
c.821C>T	p.Thr274Met	4	rs35565630	0.017768	Protective against paclitaxel-induced thrombocytopenia	Yes
c.844C>T	p.Arg282*	4	rs145922879	0.000032	Thrombocytopenia	-
c.916C>T	p.Arg306Cys	4	rs192115302	0.000386	Thrombocytopenia	-
c.920G>A	p.Arg307His	4	rs6070697	0.174998	Increased risks of treatment failure for immune-thrombocytopenia. More severe thrombocytopenia in Bernard-Soulier Bolzano patients.	-
p.952C>T	p.Arg318Trp	4	rs121918555	0.000068	Macrothrombocytopenia	No
c.959A>T	p.Lys320Met	4	-	-	Thrombocytopenia	-
c.1041C>G	p.Asn347Lys	4	rs1421750582	0.000008**	Macrothrombocytopenia	-
c.1042_1044delAAC	p.Asn348del	4	rs773183354	-	Thrombocytopenia	-
c.1075C>T	p.Arg359Trp	4	rs140943896	0.006583	Macrothrombocytopenia	Altered
c.1080dup	p.Leu361Alafs*19	4	rs1300096139	-	Macrothrombocytopenia and mild bleeding disorders	-
c.1267C>T	p.Gln423*	4	rs767041023	0.000012	Macrothrombocytopenia	-

Tableau 6: Mutations de tubulines associées à des défauts plaquettaires chez l'Homme. Les mutations (nucléotides et acides aminés), l'exon affecté, le Rs ID et sa fréquence allélique (GnomAD_Exome database comme référence), le phénotype des individus porteurs et la capacité des tubulines mutées à s'incorporer dans le réseau de microtubules sont indiqués. * GnomAD database; ** TOPMED database; *** ALFA Project database; **** Korea1K database; - non disponible.

INTRODUCTION

une macrothrombopénie héréditaire qui n'impacte pas les fonctions plaquettaires ni l'hémostase, mais qui se caractérise par la présence de plaquettes ovoïdes (non-discoïdes) ayant une bande marginale anormale. Mis à part quelques variants communs, les mutations décrites chez les patients sont très rares avec une fréquence allélique $<0.001\%$ et sont hétérozygote à phénotype dominant négatif.

La première mutation *TUBB1* qui fut rapportée dans la littérature est la substitution Q43P. Elle est toutefois fréquente dans la population et ne semble pas par elle-même pathologique car elle est aussi retrouvée chez des individus sains (Freson et al., 2005). Le premier variant causatif de macrothrombopénie fut rapporté en 2009, avec la substitution R318W (Kunishima et al., 2009). Depuis, 26 mutations ont été identifiées dans le gène *TUBB1* (Tableau 6). Elles sont essentiellement sous la forme de substitution, et affectent toutes uniquement le système plaquettaire, à l'exception de quelques-unes qui provoquent en plus une dysgénésie thyroïdienne. Tous les variants sont prédits pathogéniques (modélisation informatique par MutationTaster), mais seul un petit nombre fut réellement caractérisé au niveau fonctionnel. Pour ceux-ci, les mutations empêchent souvent l'assemblage de la tubuline β_1 mutée dans le réseau de microtubules et diminuent la capacité des mégacaryocytes à étendre des proplaquettes *in vitro* (Kunishima et al., 2014; Matsumura et al., 2019; Palma-Barqueros et al., 2021).

Par criblage haut débit réalisé sur des donneurs de sang présentant une thrombopénie modérée ($<150\text{G/L}$), des mutations dans les gènes *TUBA4A* et *TUBA8* ont récemment été identifiées par notre laboratoire pour perturber la biogenèse des plaquettes. Elles entraînent des défauts comparables à ceux des mutations *TUBB1*, présentés dans les travaux de cette thèse, ajoutant ainsi deux nouveaux isotypes α dans la liste de gènes causant des tubulinopathies plaquettaires.

OBJECTIFS DE THÈSE

Les objectifs de thèse :

La formation des plaquettes implique de profonds remaniements microtubulaires exclusifs aux cellules de cette lignée, avec notamment i) un mécanisme de polyploïdisation par cycles d'endomitose ; ii) la formation de proplaquettes, qui traversent l'endothélium des petits vaisseaux avoisinant les mégacaryocytes pour délivrer les futures plaquettes dans la circulation sanguine ; et iii) la formation d'un anneau sous-membranaire de microtubules appelé bande marginale, qui soutient la forme discoïde des plaquettes circulantes et qui ne connaît aucun équivalent chez les mammifères. **Mon projet de thèse vise à évaluer la contribution respective des différents éléments du code tubuline dans lignée plaquettaire qui sont encore très mal caractérisés. Pour cela, j'ai notamment étudié les répercussions de leur absence ou de leurs mutations à l'aide de différents modèles chez la souris et chez l'Homme.**

Premier axe : les isotypes de tubuline :

Dans la lignée plaquettaire, le répertoire de tubuline β fut très étudié depuis la découverte et la caractérisation fonctionnelle de l'isotype $\beta 1$. Par opposition, rien n'était connu des isotypes de tubuline α à mon arrivée au laboratoire. Des résultats préliminaires générés par l'équipe indiquaient toutefois que les tubulines $\alpha 4A$ et $\alpha 8$ puissent être impliquées dans la formation des plaquettes. **Le premier objectif de ma thèse fut ainsi de caractériser le rôle des isotypes $\alpha 4A$ et $\alpha 8$ dans la lignée plaquettaire. Il sera présenté sous la forme de deux projets, l'un sur l'isotype $\alpha 4A$ et l'autre sur l'isotype $\alpha 8$.**

Deuxième axe : les modifications post-traductionnelles des tubulines :

Les modifications post-traductionnelles de la tubuline ont été très peu étudiées dans la lignée plaquettaire, et leurs présences et leurs rôles restent pour la plupart encore hypothétiques. **Le deuxième objectif de ma thèse fut de caractériser, d'abord biochimiquement, puis fonctionnellement, le répertoire de modifications post-traductionnelles de la tubuline de la lignée plaquettaire. Il sera présenté sous la forme d'un seul projet, regroupant l'ensemble des données accumulées au cours de mes recherches.**

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Projet 1

L'isotype de tubuline α_4A

A. Introduction :

La tubuline $\alpha 4A$ est retrouvée dans différents tissus comme le cerveau, le muscle ou encore le système hématopoïétique, et n'occupe à ce jour aucune fonction claire. Des données préliminaires générées au laboratoire avant mon arrivée laissent toutefois présager un rôle majeur pour cet isotype dans la formation des plaquettes. Elles se basent sur i) une cinétique d'expression croissante similaire à la tubuline $\beta 1$ pendant la mégacaryopoïèse *in vitro* et ; ii) une lignée de souris homozygote portant une mutation faux-sens dans la tubuline $\alpha 4A$ (V260E) générée par mutagenèse aléatoire. De manière intéressante, cette lignée V260E n'exprime plus la tubuline $\alpha 4A$ dans la plaquette, et présente un phénotype comparable à celui des souris inactivées pour la tubuline $\beta 1$ (KOB1). Toutes deux montrent une macrothrombopénie modérée associée à la présence d'une bande marginale plaquettaire anormale composée de seulement 3 à 5 enroulements de microtubule. Par conséquent, les plaquettes V260E et KOB1 ont perdu leur forme discoïde au profit d'une morphologie ovoïde, qui n'impacte toutefois pas leurs fonctions ni l'hémostase. L'importance de l'isotype $\alpha 4A$ fut confirmée chez l'Homme suite à l'identification d'un individu porteur de mutations ponctuelles dans le gène *TUBA4A* qui récapitule les défauts des souris mutantes. Les résultats sont présentés sous la forme d'un article publié (**Annexe 1**) dans le journal *Life Science Alliance*, pour lequel je suis co-auteur.

La forte similarité phénotypique des lignées V260E et KOB1 évoquait alors une potentielle collaboration fonctionnelle des deux isotypes dans la formation des plaquettes. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que l'absence combinée des isotypes $\alpha 4A$ et $\beta 1$ puisse avoir des répercussions bien plus sévères sur le processus. Pour l'évaluer, nous avons donc généré une lignée de souris double KO (DKO). Nous attendions d'importants défauts de mégacaryopoïèse, accompagnés d'une profonde désorganisation voire d'une disparition complète de la bande marginale des plaquettes DKO. Dans le cas où un tel phénotype serait confirmé, nous pourrions de cette manière i) évaluer l'importance combinatoire des isotypes $\alpha 4A$ et $\beta 1$ dans la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse mais aussi ; ii) revisiter l'importance de la forme discoïde et de la bande marginale dans la biologie plaquettaire, par une approche génétique fiable qui s'affranchit des effets délétères des agents dépolymérisant des microtubules. Les résultats sont présentés sous la forme d'un manuscrit soumis au journal *Blood*, pour lequel je suis 1^{er} auteur.

B. Manuscrit soumis :



American Society of Hematology
2021 L Street NW, Suite 900,
Washington, DC 20036
Phone: 202-776-0544 | Fax 202-776-0545

editorial@hematology.org

Loss of α 4A- and β 1-tubulin leads to severe platelet spherocytosis and strongly impairs hemostasis in mice.

Tracking no: BLD-2022-016729

Quentin Kimmerlin (UMR S_1255 INSERM, France) Sylvie Moog (BPPS UMR-S 949, FMTS) Alexandra Yakusheva (Faculty of Physics, Moscow State University, Russian Federation) Anita Eckly (UMR-S1255 INSERM-Université de Strasbourg, France) Monique Freund (EFS-Alsace, France) Pierre Mangin (Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S1255, FMTS, France) Francois Lanza (UMR S_1255 INSERM, France)

Abstract:

Native circulating blood platelets present with a discoid flat morphology maintained by a submembranous peripheral ring of microtubules, named marginal band. The functional importance of this particular shape is still debated, but was initially hypothesized to facilitate platelet interaction with the injured vessel wall and to contribute to hemostasis. The importance of the platelet discoid morphology has since been questioned on the absence of clear bleeding tendency in mice lacking the platelet-specific β 1 tubulin isotype, which exhibits platelets with a thinner marginal band and an ovoid shape. Here, we generated a mouse model inactivated for β 1-tubulin and α 4A-tubulin, an α -tubulin isotype strongly enriched in platelets. These mice present with fully spherical platelets completely devoid of a marginal band. In contrast to the single knockout, the double deletion resulted in a severe bleeding defect in a tail-clipping assay, which was not corrected by increasing the platelet count to normal values by the thrombopoietin-analog Romiplostim. *In vivo*, thrombus formation was almost abolished in a FeCl₃-injury model, with only a thin layer of loosely packed platelets, and mice were protected against death in a model of thromboembolism. *In vitro*, platelets adhered less efficiently and formed smaller sized and loosely assembled aggregates when perfused over von Willebrand factor and collagen matrices. In conclusion, this study shows that blood platelets require two unique α - and β -tubulin isoforms to acquire their characteristic discoid morphology. Lack of these two isoforms has a deleterious effect on flowdependent aggregate formation and stability, leading to a severe bleeding disorder.

Conflict of interest: No COI declared

COI notes: The authors declare no competing financial interests.

Preprint server: No;

Author contributions and disclosures: Q.K. performed animal experimentation, platelet and megakaryocyte studies, analyzed data, and co-wrote the paper; S.M. performed animal experimentation, platelet and megakaryocyte studies and analyzed data; C.Z. performed animal experimentation; A.Y. performed animal experimentation; A.E. performed and analyzed electron microscopy imaging; M.F. took care of the animals and performed animal experimentation; P.M. discussed results and analyzed the data; F.L. designed the study, analyzed the data, and wrote the paper.

Non-author contributions and disclosures: No;

Agreement to Share Publication-Related Data and Data Sharing Statement: Please contact by email the corresponding author for any question regarding materials and methods.

Clinical trial registration information (if any):

ARTICLE TITLE: Loss of $\alpha 4 A$ - and $\beta 1$ -tubulin leads to severe platelet spherocytosis and strongly impairs hemostasis in mice.

SHORT TITLE: Platelet spherocytosis hampers hemostasis

AUTHORS: Quentin Kimmerlin¹, Sylvie Moog¹, Alexandra Yakusheva^{1,2}, Catherine Ziessel¹, Anita Eckly¹, Monique Freund¹, Pierre Mangin¹, François Lanza¹.

AFFILIATIONS OF INSTITUTIONS: ¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Etablissement Français du Sang Grand Est, Unité Mixte de Recherche-S 1255, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Université de Strasbourg, Strasbourg, France. ² Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Cellular Hemostasis Lab, Moscow, Russia.

CORRESPONDING AUTHOR: François Lanza at UMR_S1255, EFS-Grand Est site de Strasbourg, 10 rue Spielmann, F-67065 Strasbourg Cedex, France; Phone: +33 388 21 25 25; Fax: +33 388 21 25 21; E-mail: francois.lanza@efs.sante.fr

CATEGORY: Regular article, Thrombosis and Hemostasis.

Abstract word count: 249 words.

Text word count: 3994 words.

Number of figures and tables: 5 main figures, 8 supplemental figures, 1 video.

Number of references: 30.

KEY POINTS (1-2 only):

- Platelets lacking α_4A - and β_1 -tubulin are devoid of marginal band, fully spherical and inefficiently interact with matrices under flow
- Mice deficient for α_4A - and β_1 -tubulin exhibit severe defects in hemostatic and thrombotic responses *in vivo*

ABSTRACT

Native circulating blood platelets present with a discoid flat morphology maintained by a sub-membranous peripheral ring of microtubules, named marginal band. The functional importance of this particular shape is still debated, but was initially hypothesized to facilitate platelet interaction with the injured vessel wall and to contribute to hemostasis. The importance of the platelet discoid morphology has since been questioned on the absence of clear bleeding tendency in mice lacking the platelet-specific β 1 tubulin isotype, which exhibits platelets with a thinner marginal band and an ovoid shape. Here, we generated a mouse model inactivated for β 1-tubulin and α 4A-tubulin, an α -tubulin isotype strongly enriched in platelets. These mice present with fully spherical platelets completely devoid of a marginal band. In contrast to the single knockout, the double deletion resulted in a severe bleeding defect in a tail-clipping assay, which was not corrected by increasing the platelet count to normal values by the thrombopoietin-analog Romiplostim. *In vivo*, thrombus formation was almost abolished in a FeCl_3 -injury model, with only a thin layer of loosely packed platelets, and mice were protected against death in a model of thromboembolism. *In vitro*, platelets adhered less efficiently and formed smaller sized and loosely assembled aggregates when perfused over von Willebrand factor and collagen matrices. In conclusion, this study shows that blood platelets require two unique α - and β -tubulin isotypes to acquire their characteristic discoid morphology. Lack of these two isotypes has a deleterious effect on flow-dependent aggregate formation and stability, leading to a severe bleeding disorder.

INTRODUCTION

Blood platelets are produced by bone marrow megakaryocytes and are essential to arrest and prevent bleeding. In their resting state, platelets harbor a lenticular morphology that is maintained by a submembraneous microtubule marginal band¹. This remarkable structure, which has no equivalent in any other mammalian cell, comprises tightly associated microtubules forming a ring-like structure under the platelet cortex. Despite its identification more than fifty years ago² the formation and functional importance of this architectural singularity has until now escaped full comprehension. To date, several tubulin isotypes have been implicated in the biology of the marginal band: the divergent β 1-tubulin and the more generic α 4A- and α 8-tubulin isotypes. Mutations in these three isotypes found in human patients, as well as the genetic ablation of β 1-tubulin in mice, result in abnormal platelet and marginal band formation characterized by fewer or scattered microtubules coils. This translates into decreased platelet counts accompanied by an overall loss of their disc-shaped profile in favor of an ovoid morphology³⁻⁵. As of yet, it is still unclear how the tubulin isotypes participate in these processes, but one can envision that they favor microtubule bending, either directly or indirectly through particular microtubule-associated proteins. Strikingly, while these three isotypes are required for efficient platelet formation in mice and humans, they appear on their own to be dispensable for platelet functions³⁻⁶.

A longstanding hypothesis that remains to be demonstrated is that the flat shape of platelets is important for their hemostatic properties by providing an extended surface, which allows for closer contacts with the exposed matrix upon vascular lesion⁷. This would particularly influence their behavior under the hydrodynamic forces exerted inside the blood vessel. In favor of this hypothesis, but limited to the *in vitro* setting, it has been observed that spherical human platelets translocated much faster on a von Willebrand Factor (VWF) matrix when compared to their disc-shaped counterparts⁸. This behavior appeared to directly depend on the morphological differences since cold-treated, fixed spherical platelets behaved similarly. Importantly however, the spherical shape in these studies does not correspond to a native state but reflects their activation during translocation on VWF or upon cold exposure. Definitive proof for a role of the discoid platelet shape in primary

hemostasis requires models where platelets harbor a spherical shape under native resting conditions. Inducing microtubule depolymerization by low temperature, or with tubulin drugs are not suitable for *in vivo* studies as they alter the platelet native state. A more suitable approach is genetic inactivation of essential platelet tubulin isotypes. β 1-tubulin deficient mice (KOB1) represent such a model where resting platelets exhibit a lower number of microtubules in their marginal band and a loss of their discoid shape. This morphological change did, however, not translate into a significant increase in tail bleeding times, which appeared to disprove the biological importance of the platelet discoid morphology⁶. One limitation of this model, is that KOB1 platelets still exhibit a thin but tightly assembled marginal band representing $\approx 30\%$ of the normal number of microtubules and adopt an elliptic rather than fully spherical shape⁹. A stronger indication for a hemostatic role of the disc-shape morphology came from the report of a patient presenting with a bleeding diathesis and severe platelet spherocytosis¹⁰. Remarkably, his platelets were completely devoid of a marginal band and were fully spherical. Although the link between microtubule dysfunctions and bleeding was not formally established, this case raised the hypothesis that spherocytosis could on its own impede hemostasis.

In view of phenotype similarities between β 1- and α 4A -tubulin mutated patients, and since α - and β -tubulins always work as dimers, we hypothesized that defects in both subunits could amplify the deleterious effect of the single β 1 inactivation. In particular, we expected a more severe marginal band defect and complete spherocytosis, which in turn would allow to accurately determine the importance of platelet shape in their functions and hemostasis. To this end, we generated *Tuba4a* and *Tubb1* double knockout mice (DKO). In contrast to the single knockouts, the large majority of DKO platelets were fully spherical under resting conditions and their marginal band was no longer observed. Remarkably, these mice presented a marked bleeding diathesis and near absent thrombus formation in a FeCl_3 arterial injury model. *In vitro* flow assays demonstrated an unstable interaction of DKO platelets with a VWF matrix and the formation of smaller and less compact aggregates on collagen. In line with these results, DKO mice were protected from death in a thromboembolism model. These results strongly support the functional importance of the microtubule-dependent discoid shape in hemostasis and thrombus formation.

METHODS

Mice: C57Bl/6 *Tuba4a* knockout mice (KOA4A) were generated at Charles River (Grenoble, France) by CRISPR/Cas9-mediated deletion of exon 2 of the *Tuba4a* gene. They were viable, reproduced normally and did not express α 4A-tubulin (Figure S1A). C57Bl/6 *Tubb1* knockout mice (KOB1) were generated by backcrossing mixed Sv129-C57Bl/6 *Tubb1*-deficient mice (kindly provided by Ramesh Shivdasani) with C57Bl/6 mice for 5 generations. C57Bl/6 *Tuba4a* and *Tubb1* double knockout mice (DKO) were obtained by crossbreeding KOA4A and KOB1 knockout mice. Protocols involving animals were performed in accordance with the CREMEAS Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Strasbourg (Permit Number: E67-482-10).

Tail bleeding assay: Tails of anesthetized 8-20 week old mice were amputated at their distal part by 3 mm and immediately immersed in warm (37°C) 0.9% saline solution. Mice were considered as bleeders until the bleeding stopped for the first time. Bleeding was recorded for 30 min, after which it was stopped with hemostatic gauzes if it had not ceased by itself.

Flow experiments: Hirudinated whole blood was perfused on plasma captured VWF or collagen ¹¹. Platelets were visualized using differential interference contrast (DIC) microscopy with an inverted Leica DMI 4000 B microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany: 40x, 1.4 numerical aperture oil lens). Data were recorded using a CMOS camera (ORCA-Flash4.0 LT, Hamamatsu, Massy, France and analyzed using ImageJ software (National Institutes of Health).

In vivo thrombosis: Ferric chloride-induced (FeCl₃) thrombosis was performed as previously described ¹². Thrombus formation was monitored in real time with a fluorescence microscope (Leica Microsystems, San Westlar, Germany) and a CCD (charge-coupled device) camera (CoolSNAP HQ2, Photometrics, Roper Scientific). For scanning electron microscopy, the carotid arteries were fixed with 2.5% glutaraldehyde by transcardiac perfusion and excised within a 120 seconds time frame. They were subsequently fixed in 2.5% glutaraldehyde, dehydrated, dried, sectioned lengthwise and sputtered with platinum palladium, and examined under a Helios NanoLab dual beam microscope (FEI).

Venous thromboembolism: was induced by injecting a mixture of collagen (0.8 mg/kg) and adrenaline (60 µg/kg) in the jugular vein ¹³.

Statistical analyses: Results were expressed as the mean (\pm SEM). Statistical comparisons were performed as described in the figure legends. Normality and equality of variance were evaluated with a Shapiro-Wilk and a Bartlett's test, respectively.

Data Sharing Statement: Please contact by email the corresponding author for any question regarding materials and methods.

RESULTS

Loss of the marginal band in the combined absence of $\alpha 4A$ - and $\beta 1$ -tubulins leads to platelet spherocytosis.

To evaluate the hypothesis that $\beta 1$ - and $\alpha 4A$ -tubulin isotypes cooperate in sustaining platelets discoid shape, we generated a mouse strain doubly inactivated for these two isotypes (DKO) (**Figure S1A**). DKO mice had reduced platelet counts and increased volumes (with counts and volumes representing 42% and 153% of those in wild-type (WT) mice, respectively; **Figure 1A-B**). A similar, but less pronounced phenotype was observed in *Tubb1*-deficient mice (KOB1), with counts and volumes representing 66% and 142% of the wild-type values, respectively. By contrast, single knockout of *Tuba4a* (KOA4A) did not significantly affect platelet counts and sizes. No difference in leukocyte and red blood cell counts were observed between the four strains showing that the defect is restricted to the platelet lineage (**Figure S1B-C**). Apart from the remarkable change in volume, platelets lacking $\alpha 4A$ - and $\beta 1$ -tubulin showed profound alterations of shape and ultrastructure. In transmission electron microscopy images, almost all DKO platelets (97%) lacked the typical discoid shape, with 73% appearing as round and 24% as oval (**Figure 1C-D**). Focused Ion Beam-Scanning Electron Microscopy analysis illustrated the spherical morphology of DKO platelets, but also revealed an increase in the organelle numbers when compared to WT that likely reflects the increased volumes of these platelets (**Video 1** and **Figure S2A-C**). Transmission electron microscopy examination of KOB1 platelets confirmed the previously reported loss of discoid shape⁹ and highlighted that these platelets mostly displayed an ovoid or elliptical shape (68%) rather than a fully round shape (24%). Therefore, the loss of the $\beta 1$ -tubulin isotype alone is less deleterious than loss of both, $\beta 1$ - and $\alpha 4A$ -tubulin.

In striking contrast with wild-type platelets, where 9-12 bundled microtubules were observed in transversal sections, microtubules were very rarely visualized in DKO platelets, and when observed, they appeared as separate entities (**Figure S3A**). Fluorescence microscopy observation confirmed the lack of a marginal band in 84% of DKO platelets which closely matches the proportion of round elements observed in transmission electron microscopy (**Figure S3B**). Taken together, the spherical

shape of DKO platelets and the profound microtubule deficiency compose a novel and unique phenotype, distinct from that in normal and single tubulin knockout platelets, and which differs from all known models of macrothrombocytopenia.

One possible cause for the absence of a marginal band in DKO mice could be an insufficient amount of tubulin dimers precluding efficient microtubule growth. ELISA quantification of total α -tubulin indeed revealed a decrease in total tubulin levels in DKO platelets, which represented 38% of those in the wild-type (**Figure 1C**). KOB1 platelets also exhibit a decreased content of total α -tubulin (47% of wild-type levels), but contrary to the DKO maintain the ability to assemble a minimal marginal band composed of 3-4 microtubules⁹. The additional decrease in tubulin content in DKO platelets is somewhat moderate but we cannot eliminate the possibility that it reaches subcritical concentrations for microtubule polymerization.

An additional hypothesis to explain the defect is that microtubule assembly is not altered in itself but that platelet microtubules are unstable in the absence of these two essential isotypes. To test this hypothesis, DKO platelets were treated with Taxol in order to promote microtubule polymerization. Remarkably, microtubules were clearly observed by fluorescence microscopy in 85% of the platelets in Taxol treated platelets compared to only 15% in the untreated DKO control (**Figure S3C-D**). A fraction of these microtubule-positive platelets harbored a marginal band-like structure, although the large majority presented a less structured microtubule array. Taxol treatment did not affect the marginal bands of WT, KOA4A and KOB1 platelets (not shown). Altogether, these results suggest that the lack of visible microtubules in DKO platelets could result from a subcritical tubulin content or unstable microtubules caused by the combined lack of two complementary isotypes.

Megakaryocyte maturation and proplatelet extension are severely hampered in the absence of α 4A- and β 1-tubulins.

The low platelet counts in DKO mice could possibly be due to their increased removal from the circulation or a decreased production. Platelet survival curves, generated by *in vivo* biotinylation, were superimposable to those in the WT mice, demonstrating normal recirculation (**Figure 2A**). We then

examined whether megakaryopoiesis could be affected. The proportion of bone marrow MEP and MKP progenitors (**Figure 2B-C**), and the ploidy of CD42⁺ megakaryocytes (MKs) (**Figure S4A**) of DKO mice were similar to those in the WT, the KOA4A and the KOB1 mice. On the other hand, the MK density was increased (**Figure 2D**), and fewer MKs reached the most mature stage (Stage III) in DKO compared to WT, KOA4A and KOB1 as analyzed by transmission electron microscopy of the bone marrow (**Figure 2E**). In addition, a number of DKO stage III MKs showed defects in their DMS, with tighter membrane contacts and signs of actin accumulation (**Figure 2F**). This defect was also found in the KOA4A and KOB1 MKs, but to a much lesser extent. When MKs were differentiated from bone marrow Lin⁻ progenitors, large DKO MKs were obtained, which however were unable to extend proplatelets, similar to KOB1 MKs (**Figure S4B**). In contrast, KOA4A MKs formed proplatelets normally. Therefore, the worsened macrothrombocytopenia of DKO mice when compared to KOB1 could stem from additional megakaryocyte maturation defects.

α 4A- and β 1-tubulin double deficiency severely impacts hemostasis and thrombus formation.

Peritoneal bleeding was noticed in DKO mice upon abdomen incision, an event which was never observed in WT, KOA4A or KOB1 mice. To explore this further, tail bleeding assays were performed which revealed a marked bleeding tendency in DKO compared to WT mice, with a majority of DKO mice (71%) still bleeding 30 min after injury, in comparison with 6% of WT, 16 % of KOA4A and 33% of KOB1 mice (**Figure 3A**). A possible reason for the increased bleeding severity in DKO could be their low platelet count. To evaluate this, DKO mice were treated with the TPO-analog Romiplostim to increase their platelet counts without modifying platelet volume (**Figure S5A-B**), a treatment which was adapted to preserve the expression of key surface glycoproteins, including the collagen receptor GPVI, and normal activation (**Figure S5C-D**). Under these conditions, there was no improvement of the bleeding diathesis, despite platelet counts reaching wild-type levels (**Figure 3A**).

We then asked whether the hemostatic defect would be accompanied by a decreased capacity to form a thrombus *in vivo*. In a carotid ferric chloride injury model, which combines high shear rate conditions and a damage to the endothelium¹⁴, only a thin layer of platelets accumulated at the site of lesion in DKO, whereas thrombi progressively grew to almost occlude the artery in WT mice (**Figure**

3B). At its maximum the thrombus size only represented 14% of that in WT animals (**Figure 3C and S6**). Close examination at the injury site by scanning electron microscopy revealed that the inner wall of the vessel was unevenly covered by platelets in DKO mice, leaving most areas with only a few layers of platelets and devoid of major aggregates. Close-up views showed that these platelets were loosely packed, and appeared as spherical elements extending filopodia (**Figure 3D**). In contrast, the thrombus was voluminous in the WT, showed densely packed platelets in its center and loosely aggregated discoid platelets at the outer surface, in agreement with the previously described core/shell architecture of these thrombi¹⁵. Thrombus formation in KOA4A and KOB1 mice differed from that in DKO, since it reached a maximal surface close to that in WT with however a tendency towards faster resorption.

In view of the loose aspect of the thrombi in the DKO we next examined whether these mice would have a lower tendency to occlude their microcirculation in a model of thromboembolism induced by a jugular injection of a mixture of collagen and adrenaline. Whereas the wild-type and single knock-out mice all died rapidly after injection, DKO mice were protected against death, with 83% survivors during a 30 min observation period (**Figure 3E**).

Decreased flow-dependent adhesion and aggregation

Abnormal hemostasis and thrombosis in DKO mice could originate from defective platelet activation responses. However, surface exposure of the major platelet glycoproteins and of activated integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ and P-selectin was not decreased in DKO platelets (**Figure S7A-B**). Similarly, platelet aggregation in a turbidimetric assay was not decreased but rather slightly increased in DKO mice following activation by ADP, thrombin or collagen (**Figure S7C-D**) and collagen + adrenaline stimulation (**Figure S8**), thus questioning an intrinsic defect in intracellular signaling under the low shear conditions of these types of assays.

The primary event in platelet plug formation *in vivo* is their shear dependent interaction with VWF that could be affected by the abnormal platelet shape in DKO. To explore this, we performed blood perfusion studies in microchannels coated with a VWF-binding antibody, which allows for its capture

directly from the blood that is perfused in the microfluidic device. Care was taken to confirm equal levels of plasma VWF in DKO mice (**Figure S9**), and to allow a slight delay before recording the videos to ensure the proper capture of the plasma VWF. In this assay, whereas WT and KOA4A platelets adopted a sliding or flip-flop mode of displacement, KOB1 and DKO platelets rolled over the VWF matrix. This occurred at a much higher speed for DKO platelets compared to KOB1, KOA4A and WT platelets (**Figure 4A-D**). Additionally, DKO platelets were more easily detached from the matrix when compared to KOB1 (**Figure 4E-F**). Interestingly, this abnormal interaction was observed at both high ($3,000\text{ s}^{-1}$) and low (500 s^{-1}) shear rates suggesting that it could affect hemostasis equally in the arteries and veins.

Additional flow-dependent defects were explored upon exposure to the more reactive collagen matrix, which results in the formation of platelet thrombi upon perfusion of wild-type blood. Time-course analyses revealed a delay in thrombus build-up when DKO blood was perfused and a significant decrease in the surface area occupied by platelets representing 66% of that in the wild-type at 1.75 min (**Figure 5A-B**). Similar results were obtained when the platelet count was brought to normal values by Romiplostim administration indicating that formation of smaller thrombi was not due to the lower platelet count. Altogether, these results strongly suggest that the abnormal platelet shape is an important contributor of the hemostatic defects in DKO mice.

DISCUSSION

Of all the blood cellular components, platelets uniquely exhibit a very small size and a discoid shape maintained by the microtubule marginal band. This flat morphology endows platelets particular hydrodynamic properties, and has long been hypothesized to contribute to hemostasis. The hypothesis has however been questioned when KOB1 mice showed no major bleeding tendency despite presenting with platelets lacking the typical disc-shaped morphology. Nonetheless, these results do not fully disprove the original theory, since KOB1 platelets still exhibit a residual marginal band composed of 2-3 microtubules, leaving their platelets ovoid rather than fully spherical⁹. Here, we have generated a mouse model doubly inactivated for β 1- and α 4A-tubulin, which presents an unprecedented degree of platelet spherocytosis due to a complete lack of marginal band. Interestingly, the double deletion had a profound negative impact on hemostatic and thrombotic responses *in vivo*. This could not be attributed to an overall decrease in platelet reactivity, but was more likely caused by inefficient matrix interaction and an impaired capacity to form cohesive aggregates under hemodynamic conditions.

Presently, the process of marginal band formation is not fully understood, and the reason for the lack of this structure in DKO platelets is still unclear. Marginal band-like structures can be readily observed in cultured megakaryocytes when they extend thin cytoplasmic projections, the so-called proplatelets. This process is powered by microtubules, which slide along the shaft of the proplatelets and buckle at their extremity^{16,17}. By contrast, marginal band assembly is less defined *in vivo* where proplatelets do not initially contain the well-organized bundles of microtubules that coil at their distal end¹⁸. Instead, the marginal band is formed in the circulation after proplatelet elements get remodeled into *bona fide* individual platelets. Knowing that growing microtubules have been observed in circulating platelets, it is likely that tubulin polymerization might take part in marginal band formation *in vivo*¹⁹. Therefore, the quantitative deficit in total tubulin of DKO platelets could well result in suboptimal concentrations that may prevent proper microtubule polymerization. Another hypothesis to explain the lack of marginal band in DKO platelets, is that microtubules lacking the β 1- and α 4A-tubulin may be less amenable to bend and to form such structure. This hypothesis

is supported by the fact that β 1-tubulin was shown to induce bends in CHO cells ²⁰ and that microtubule buckling in muscle cells is reduced when tubulin tyrosination levels are increased ²¹, such as when the naturally detyrosinated α 4A-tubulin isotype is missing ⁴. Altogether, the combination of reduced tubulin content and the potential inability of microtubules to curve could account for the absence of marginal band in DKO platelets. In agreement with this, the microtubule-agent taxol, which stabilizes growing microtubule and decreases their flexural rigidity ²², partially restore this phenotype.

Round platelets can be obtained by chemical treatment or cold exposure to depolymerize their marginal band, but this occurs at the expense of their activation and uncontrolled cytoskeletal modifications, thereby preventing proper evaluation of the discoid shape in platelet functions. Here, our genetic approach allowed to circumvent these limitations and provided an ideal model to explore this question. Despite their profound spherocytosis and the lack of marginal band, DKO platelets presented no other structural anomaly, did not exhibit signs of activation at rest, and their responses to agonists were well preserved. Therefore, the marked bleeding tendency observed in DKO mice represents the strongest evidence to date that the native platelet discoid shape sustained by its microtubule scaffold is required for normal hemostasis, supporting a longstanding proposal in the field. Such a severe bleeding stands out from previous mouse models with tubulin deficiencies and is usually observed only when platelets are missing essential platelet receptors such as integrin α IIb β 3 or GPIb-IX or in the occurrence of a profound thrombocytopenia ²³⁻²⁵. Arguably DKO mice have a decreased platelet count but which still represents 42% of that in wild-type mice. This level is well above the reported threshold of $100-25 \cdot 10^9$ platelets/L ($\approx 10-2.5\%$ of WT) for bleeding occurrence in mice ²⁵. More importantly bleeding was still observed when the platelet count of DKO mice was brought to normal levels. Moreover, KOB1 mice which are also moderately thrombocytopenic (65% of WT) did not exhibit a severe bleeding. Altogether, these results strongly support the notion that the bleeding deficiency in DKO mice is largely influenced by the abnormal platelet shape provided by the absence of a supportive microtubule cytoskeleton.

Additional to increased bleeding, DKO mice also exhibit a major defect in thrombus formation in a classic FeCl₃ arterial-injury model. Remarkably, thrombus buildup was nearly abrogated resembling the most severe defects observed in the absence of essential platelet receptors such as GPIb-IX, integrin α Ib β 3 or P2Y₁₂ ^{23,26,27}. Here again, the low platelet count is not expected to play a major role since thrombus formation is only severely impaired when platelet counts reach \approx 10% of normal levels in a carotid artery FeCl₃-injury model ²⁵. In DKO, the thrombi remained of small size even at late observation times indicating that inefficient platelet accretion was not simply due to a delayed process. This rather suggested that the spherical shape of the platelets is hampering their interaction with the injured vessel and the initially attached platelets. Platelet margination, the process whereby erythrocytes flowing at the center of the blood vessel push platelets towards the vessel wall, has been suggested to be influence by platelet shape, which appears to be less efficient with spherical elements and could therefore represent a second mechanism to explain the defect in thrombus formation ^{28,29}.

Flow experiments on VWF, which explore *in vitro* the first stage of platelet interaction with the exposed subendothelium, revealed higher translocation speeds and easier detachment of DKO platelets. This behavior has been previously observed in VWF flow studies of normal human platelets upon their spherical transformation during high shear perfusion, reflecting an active state ⁸. In the present study, perfusion was initiated with spherical platelets at a resting state, and their interaction defect was observed at high and low shear rates. Flow studies on a collagen matrix at high shear, corresponding to those of the carotid artery ³⁰, further revealed formation of smaller aggregates in the DKO, reminiscent of the observations in the FeCl₃ thrombosis model. Altogether, the *in vitro* flow studies indicate that the lack of a microtubule network and associated sphericity result in a combined deficiency in platelet attachment to the matrix and thrombus buildup. A plausible explanation for the resistance to death in DKO mice is that friable aggregates are more easily cleared under the high shear conditions of the pulmonary microcirculation.

In conclusion, our study presents the strongest evidence to date that the discoid shape of blood platelets is more than an accessory attribute but is perfectly suited to favor interaction with the injured vessel wall and that its absence drastically hinders hemostasis.

ACKNOWLEDGMENTS: This work was supported by the University of Strasbourg and by The Fondation pour la Recherche Médicale (grant FDT202106013085 to QK). We warmly thank Carsten Janke for the excellent discussions and critical review of the manuscript, Ketty Knez-Hippert for her valuable advices on animal welfare and management, and Jean-Yves Rinckel and Fabienne Proamer for their exceptional technical expertise in electron microscopy. We also thank Juliette Mulvihill for reviewing the English of the manuscript.

AUTHORSHIP: Contributions: Q.K. performed animal experimentation, platelet and megakaryocyte studies, analyzed data, and co-wrote the paper; S.M. performed animal experimentation, platelet and megakaryocyte studies and analyzed data; C.Z. performed animal experimentation; A.Y. performed animal experimentation; A.E. performed and analyzed electron microscopy imaging; M.F. took care of the animals and performed animal experimentation; P.M. discussed results and analyzed the data; F.L. designed the study, analyzed the data, and wrote the paper.

CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURES

The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

1. White JG, Rao GHR. Microtubule coils versus the surface membrane cytoskeleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape. *Am. J. Pathol.* 1998;152(2):597–609.
2. Behnke O. Further studies on microtubules. A marginal bundle in human and rat thrombocytes. *J. Ultrastruct. Res.* 1965;13(5):469–77.
3. Burley K, Westbury SK, Mumford AD. TUBB1 variants and human platelet traits. *Platelets.* 2018;29(2):209–211.
4. Strassel C, Magiera MM, Dupuis A, et al. An essential role for α 4A-tubulin in platelet biogenesis. *Life Sci. alliance.* 2019;2(1):e201900309.
5. Kimmerlin Q, Dupuis A, Bodakuntla S, et al. Mutations in the most divergent α -tubulin isotype, α 8-tubulin, cause defective platelet biogenesis. *J. Thromb. Haemost.* 2022;20(2):461–469.
6. Italiano JE, Bergmeier W, Tiwari S, et al. Mechanisms and implications of platelet discoid shape. *Blood.* 2003;101(12):4789–96.
7. Mody NA, Lomakin O, Doggett TA, Diacovo TG, King MR. Mechanics of transient platelet adhesion to von Willebrand factor under flow. *Biophys. J.* 2005;88(2):1432–43.
8. Maxwell MJ, Dopheide SM, Turner SJ, Jackson SP. Shear induces a unique series of morphological changes in translocating platelets: effects of morphology on translocation dynamics. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26(3):663–9.
9. Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, et al. A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr. Biol.* 2001;11(8):579–86.
10. White JG, de Alarcon PA. Platelet spherocytosis: a new bleeding disorder. *Am. J. Hematol.* 2002;70(2):158–66.
11. Receveur N, Nechipurenko D, Knapp Y, et al. Shear rate gradients promote a bi-phasic thrombus formation on weak adhesive proteins, such as fibrinogen in a VWF-dependent manner. *Haematologica.* 2020;105(10):2471–2483.
12. Janus-Bell E, Yakusheva A, Scandola C, et al. Characterization of the Role of Integrin α 5 β 1 in Platelet Function, Hemostasis, and Experimental Thrombosis. *Thromb. Haemost.* 2021;

13. Léon C, Freund M, Ravanat C, et al. Key role of the P2Y(1) receptor in tissue factor-induced thrombin-dependent acute thromboembolism: studies in P2Y(1)-knockout mice and mice treated with a P2Y(1) antagonist. *Circulation*. 2001;103(5):718–23.
14. Grover SP, Mackman N. How useful are ferric chloride models of arterial thrombosis? *Platelets*. 2020;31(4):432–438.
15. Stalker TJ, Traxler EA, Wu J, et al. Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. *Blood*. 2013;121(10):1875–85.
16. Patel SR, Richardson JL, Schulze H, et al. Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood*. 2005;106(13):4076–85.
17. Bender M, Thon JN, Ehrlicher AJ, et al. Microtubule sliding drives proplatelet elongation and is dependent on cytoplasmic dynein. *Blood*. 2015;125(5):860–8.
18. Bornert A, Boscher J, Pertuy F, et al. Cytoskeletal-based mechanisms differently regulate in vivo and in vitro proplatelet formation. *Haematologica*. 2021;106(5):1368–1380.
19. Patel-Hett S, Richardson JL, Schulze H, et al. Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules. *Blood*. 2008;111(9):4605–16.
20. Yang H, Ganguly A, Yin S, Cabral F. Megakaryocyte lineage-specific class VI β -tubulin suppresses microtubule dynamics, fragments microtubules, and blocks cell division. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2011;68(3):175–87.
21. Robison P, Caporizzo MA, Ahmadzadeh H, et al. Detyrosinated microtubules buckle and bear load in contracting cardiomyocytes. *Science*. 2016;352(6284):aaf0659.
22. Mitra A, Sept D. Taxol allosterically alters the dynamics of the tubulin dimer and increases the flexibility of microtubules. *Biophys. J*. 2008;95(7):3252–8.
23. Strassel C, Nonne C, Eckly A, et al. Decreased thrombotic tendency in mouse models of the Bernard-Soulier syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2007;27(1):241–7.
24. Hodivala-Dilke KM, McHugh KP, Tsakiris DA, et al. Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J. Clin. Invest*. 1999;103(2):229–38.
25. Morowski M, Vögtle T, Kraft P, et al. Only severe thrombocytopenia results in bleeding and defective thrombus formation in mice. *Blood*. 2013;121(24):4938–47.

26. Evans DJW, Jackman LE, Chamberlain J, et al. Platelet P2Y(12) receptor influences the vessel wall response to arterial injury and thrombosis. *Circulation*. 2009;119(1):116–22.
27. Eckly A, Hechler B, Freund M, et al. Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* 2011;9(4):779–89.
28. Vahidkhah K, Bagchi P. Microparticle shape effects on margination, near-wall dynamics and adhesion in a three-dimensional simulation of red blood cell suspension. *Soft Matter*. 2015;11(11):2097–109.
29. Chang H-Y, Yazdani A, Li X, et al. Quantifying Platelet Margination in Diabetic Blood Flow. *Biophys. J.* 2018;115(7):1371–1382.
30. Pantelev MA, Korin N, Reesink KD, et al. Wall shear rates in human and mouse arteries: Standardization of hemodynamics for in vitro blood flow assays: Communication from the ISTH SSC subcommittee on biorheology. *J. Thromb. Haemost.* 2021;19(2):588–595.

RESULTATS EXPERIMENTAUX – PROJET 1

TABLES:

None.

FIGURE LEGENDS:

Figure 1. Loss of $\alpha 4A$ - and $\beta 1$ -tubulin leads to severe spherocytosis and prevents marginal band formation. **A.** Blood platelet counts of WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1) and DKO mice. Results are expressed in G/L. Bar graph representing the mean \pm SEM. Each data point corresponds to an individual mouse. N>20 per strain. Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA followed by Tukey’s HSD post-hoc test. **B.** Mean platelet volumes of WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1) and DKO mice. Results are expressed in fL. Bar graph representing the mean \pm SEM. Each data point corresponds to an individual mouse. Statistical analysis was conducted by Welch ANOVA followed by Dunnett T3 post-hoc test. **C.** Representative transmission electron micrographs of WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1) and DKO platelets. The top panels correspond to a large field of view. The lower panels correspond to a close up view and higher magnifications in the lower right corners show a cross-sectioned microtubule marginal band for WT, KOA4A, and KOB1 platelets, that is absent in DKO platelets. Scale bar = 5 μ m (top panel), 1 μ m (bottom panel) and 250 nm (lower right corner). **D.** Distribution of WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1) and DKO platelets according to their morphology. Platelets were manually ranked based on their morphology (disc, oval or round). Results are expressed in % of each class. Bar graph (stacked) represents the mean \pm SEM, with at least >100 platelets per genotype counted. Statistical analysis of the round morphology was conducted by one-way ANOVA followed by Tukey’s HSD post-hoc test, with DKO as a reference. *** = p<0.001. **E.** ELISA quantification of total tubulin of platelet lysates of WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1) and DKO mice. Results are expressed in fg per platelet. Bar graph representing the mean \pm SEM. Each data point corresponds to an individual platelet lysate, obtained from a single mouse. N>3 per group. Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA followed by Tukey’s HSD post-hoc test.

Figure 2. Megakaryopoiesis is severely hampered in the absence of $\alpha 4A$ - and $\beta 1$ -tubulin.

A. Flow cytometry analysis of platelet survival by *in vivo* biotinylation in WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1) and DKO mice. Graph representing the proportion over time of circulating biotin-labelled platelets. Results are expressed in %. Each symbol representing the mean \pm SEM. N=4 for each strain. Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA followed by Tukey’s HSD post-hoc test (ns: p>0.05). **B-C.** Flow cytometry analysis of (B) MEP (Lin⁻ CD16/32⁻ Sca-1⁻ ckit⁺ CD150⁺ CD9dim)

and (C) MKP (Lin⁻ CD16/32⁻ Sca-1⁻ ckit⁺ CD150⁺ CD9bright) populations in freshly isolated, lineage-depleted bone marrow cell suspensions from WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1) and DKO mice. Results are expressed as % of the Lin⁻ CD16/32⁻ Sca-1⁻ ckit⁺ cell population. Bar graphs representing the mean \pm SEM. Each data point corresponds to an individual experiment. N=3. Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test. **D.** Megakaryocytes were manually counted from transmission electron micrographs of bone marrow sections of WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1) and DKO mice. Results are expressed as number of megakaryocytes per unit of surface (16,000 μ m²). Bar graph representing the mean \pm SEM. Each data point corresponds to an individual mouse. Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test. **E.** Megakaryocytes from WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1) and DKO mice were manually classified (stages I, II, and III) based on morphological criteria, evaluated from transmission electron micrographs of bone marrow sections. Results are expressed as % of each class. Stacked bar graph representing the mean \pm SEM. N=3 with at least 30 megakaryocytes counted per preparation. Statistical analysis of the stage III megakaryocytes was conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test, with DKO as a reference. *** = $p < 0.001$. **F.** Representative transmission electron micrographs of stage III megakaryocytes observed in bone marrow sections of WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1) and DKO mice. Bottom panels show close-up views of the demarcation membrane system. Scale bar = 5 μ m (top panels) and 2 μ m (bottom panels).

Figure 3. Loss of α 4A- and β 1-tubulin severely impairs hemostatic and thrombotic responses *in vivo*. **A.** Percentage of bleeders over time following a 3 mm tail tip amputation for WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1) and DKO mice and Romiplostim-treated DKO mice (DKO+R). Results are represented as Kaplan-Meier survival curves. For Romiplostim-treated animals, mice were administered a single dose (100 μ g/kg) 6 days prior to the experiment. N>6 per group. Statistical analysis was conducted by the Log-Rank test. **B.** Representative fluorescence micrographs of thrombi formed at 14, 28 and 40 min after topical application of ferric-chloride to the carotid artery of WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1) and DKO mice. Platelets were labeled by DiOC6 injection. **C.** Thrombus area quantification after topical application of ferric-chloride to the carotid artery of WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1) and DKO mice. N>5 per strain. **D.** Representative scanning electron micrographs of WT and

DKO thrombi in trans-sectioned carotid arteries that have been fixed 7 min after topical application of ferric-chloride. **E.** Percentage of survival over time of WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1) and DKO mice in a venous thromboembolism model following an injection in the jugular vein of a mixture of collagen (0.8 mg/kg) and adrenaline (60 µg/kg). Results are represented as Kaplan-Meier survival curves. N>3 per group. Statistical analysis was conducted by the Log-Rank test.

Figure 4. Platelet adhesion onto von Willebrand Factor matrices under flow is reduced in the absence of $\alpha 4A$ - and $\beta 1$ -tubulin. **A-B.** Representative DIC micrographs of WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1) and DKO platelets rolling onto captured VWF at (A) 500 and (B) 3,000 reciprocal seconds. Hirudinized whole blood was perfused into PDMS channels coated with the VWF-capturing peptide (vA3-III-23, 100 µg/mL). Blood was allowed to flow for 15 seconds before recording videos. For each micrograph, the dotted white circle indicates the initial position of one platelet, and the full white circle indicates its position after 800 ms. Scale bar: 10 µm. **C-D.** Rolling velocity of WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1) and DKO platelets onto captured VWF at (C) 500 and (D) 3,000 reciprocal seconds. Velocities are expressed as µm/s and were determined based on DIC recordings. Bar graphs represent the mean \pm SEM. Each symbol indicates an individual flow. N=3 per strain, with at least >15 platelets counted per individual flow. Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test. **E-F.** Platelet detachment from the VWF surface at (E) 500 and (F) 3,000 reciprocal seconds was determined by tracking individual KOB1 (B1) and DKO platelets during 30 seconds on DIC recordings. Results are expressed in %. Bar graphs representing the mean \pm SEM. Each symbol indicates an individual flow. N=3 per strain, with \geq 15 platelets counted per individual flow. Statistical analysis was conducted by unpaired two-tailed student's t-test.

Figure 5. Platelet aggregates formation onto type I collagen matrices under flow is impaired in the absence of $\alpha 4A$ - and $\beta 1$ -tubulin. **A.** Representative DIC micrographs of aggregates formed after perfusion of hirudinized blood of WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1), DKO mice and Romiplostim-treated DKO (DKO+R) mice for 105 seconds at 3,000 reciprocal seconds into Type-I collagen-coated (200 µg/mL) PDMS channels. Scale bar = 50 µm. **B.** Bar graph representing the mean surface \pm SEM of WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1), DKO mice and Romiplostim-treated DKO aggregates formed under

RESULTATS EXPERIMENTAUX – PROJET 1

the same condition. Results are expressed in aggregates per μm^2 . Each symbol indicates an individual flow. $N \geq 3$ per groups, with at least 250 aggregates counted per individual flow. Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test.

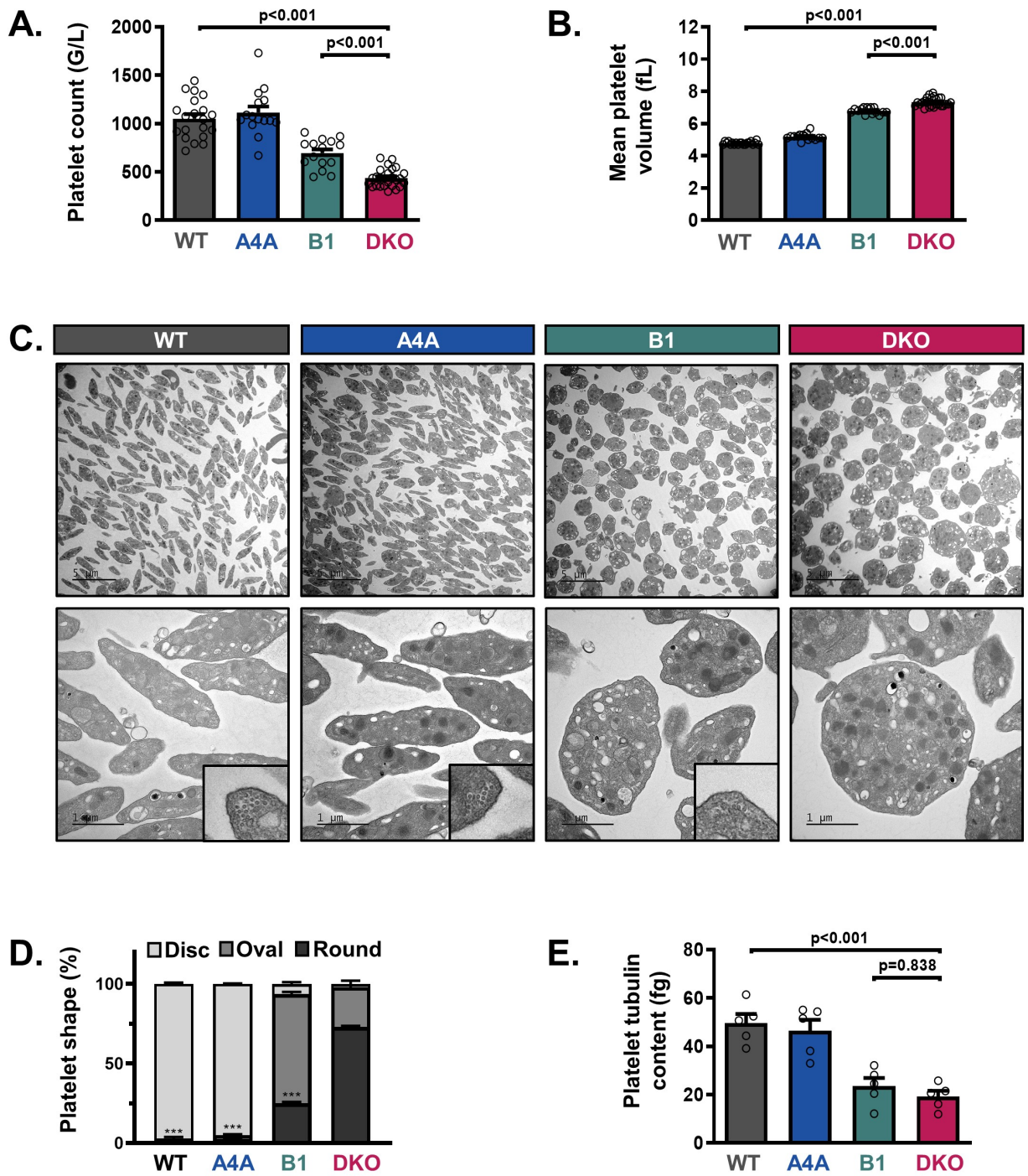


Figure 1

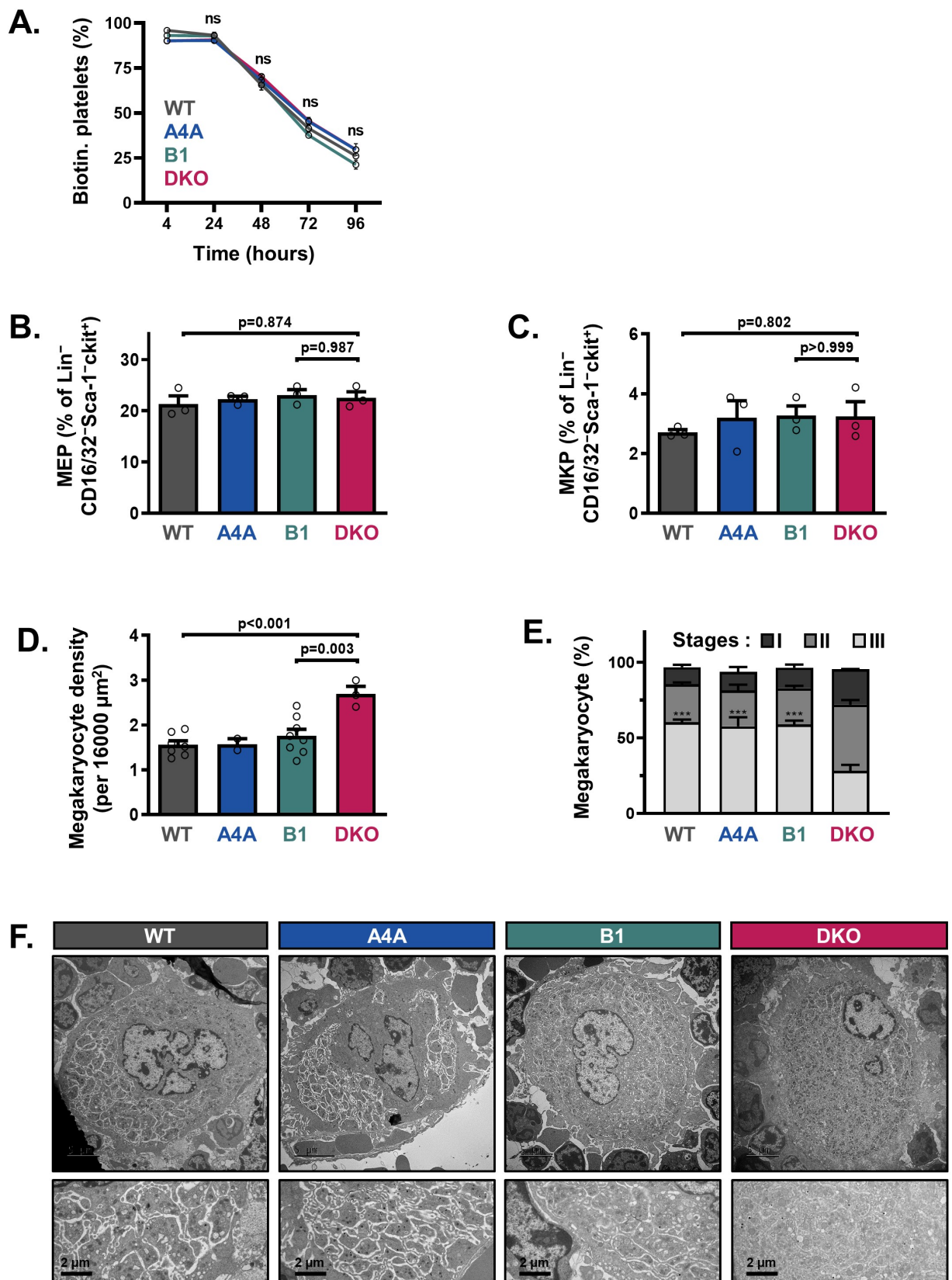


Figure 2

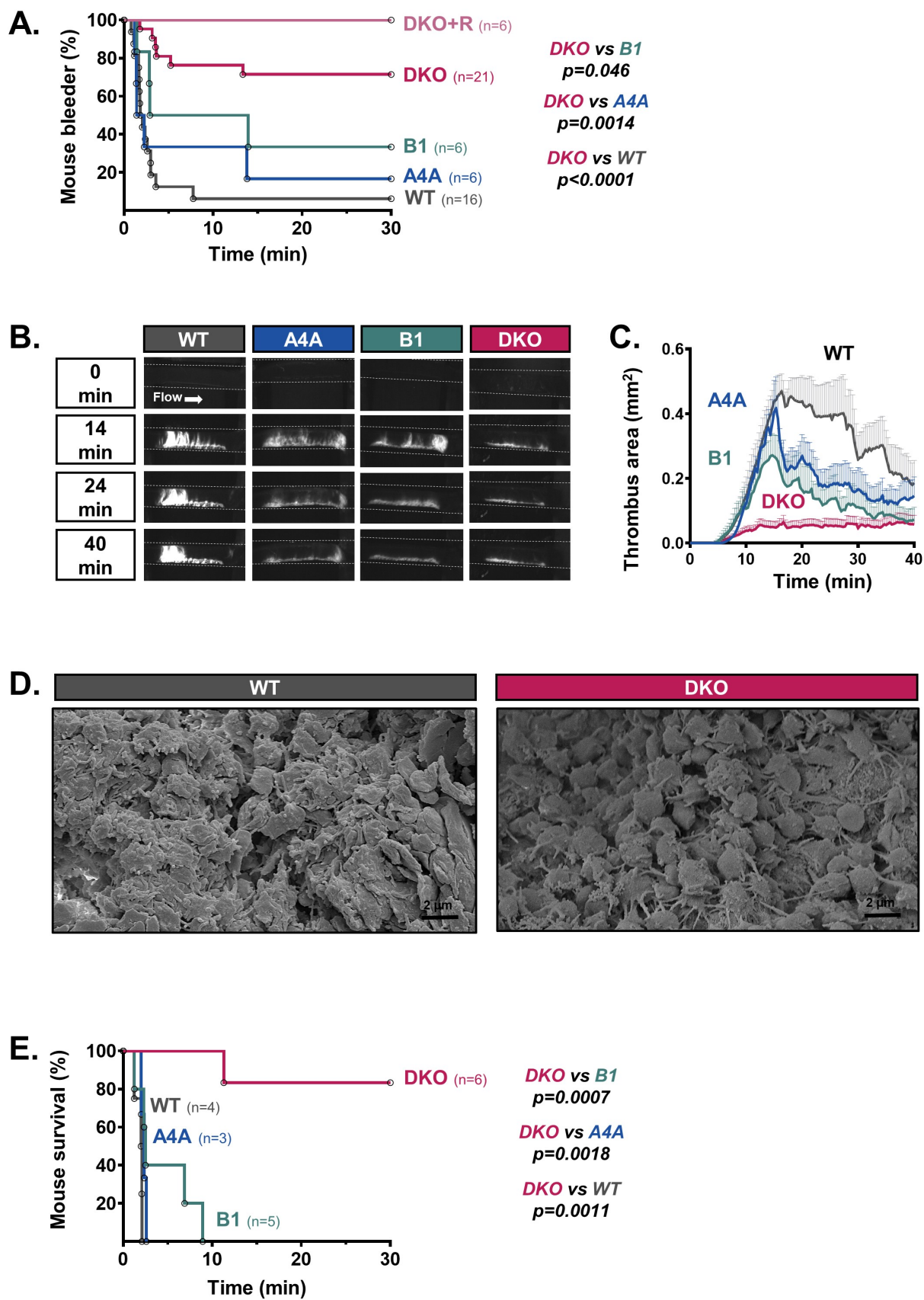


Figure 3

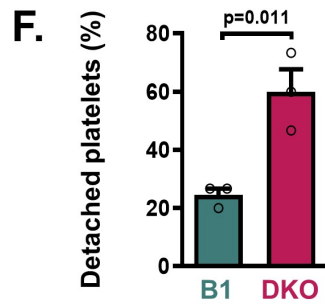
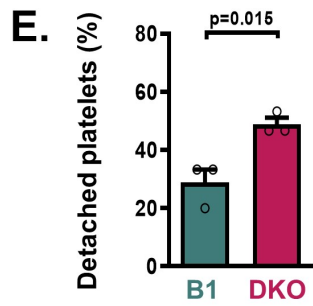
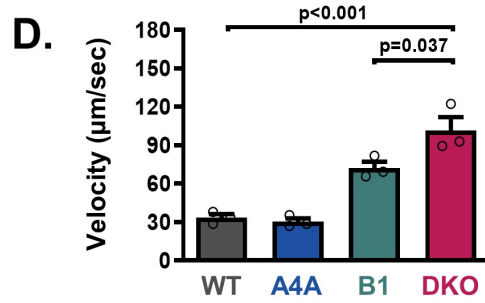
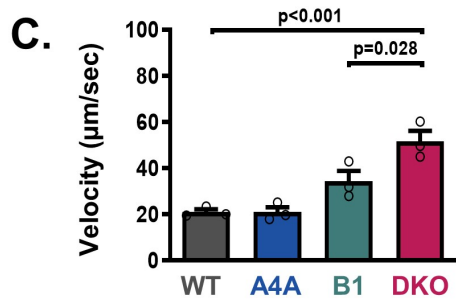
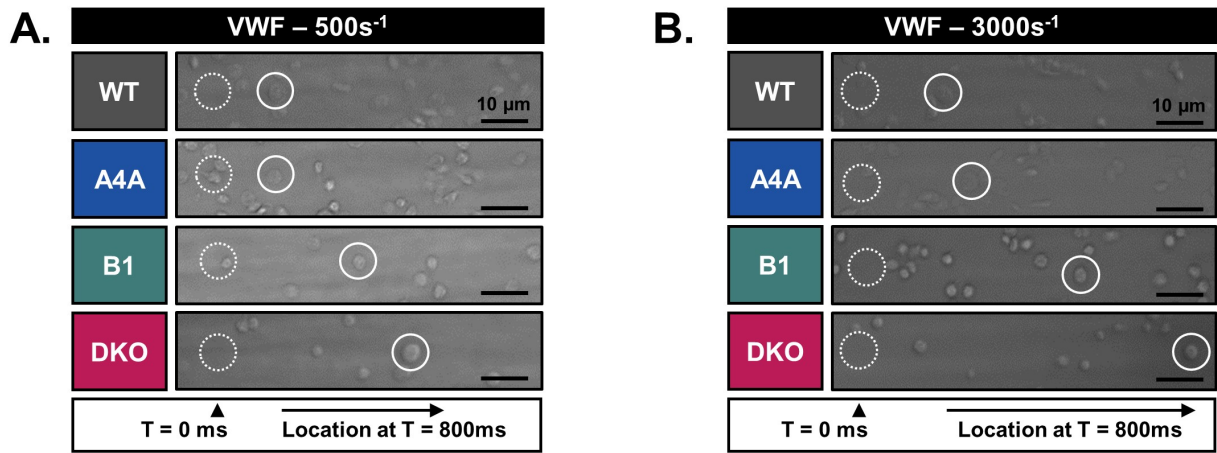


Figure 4

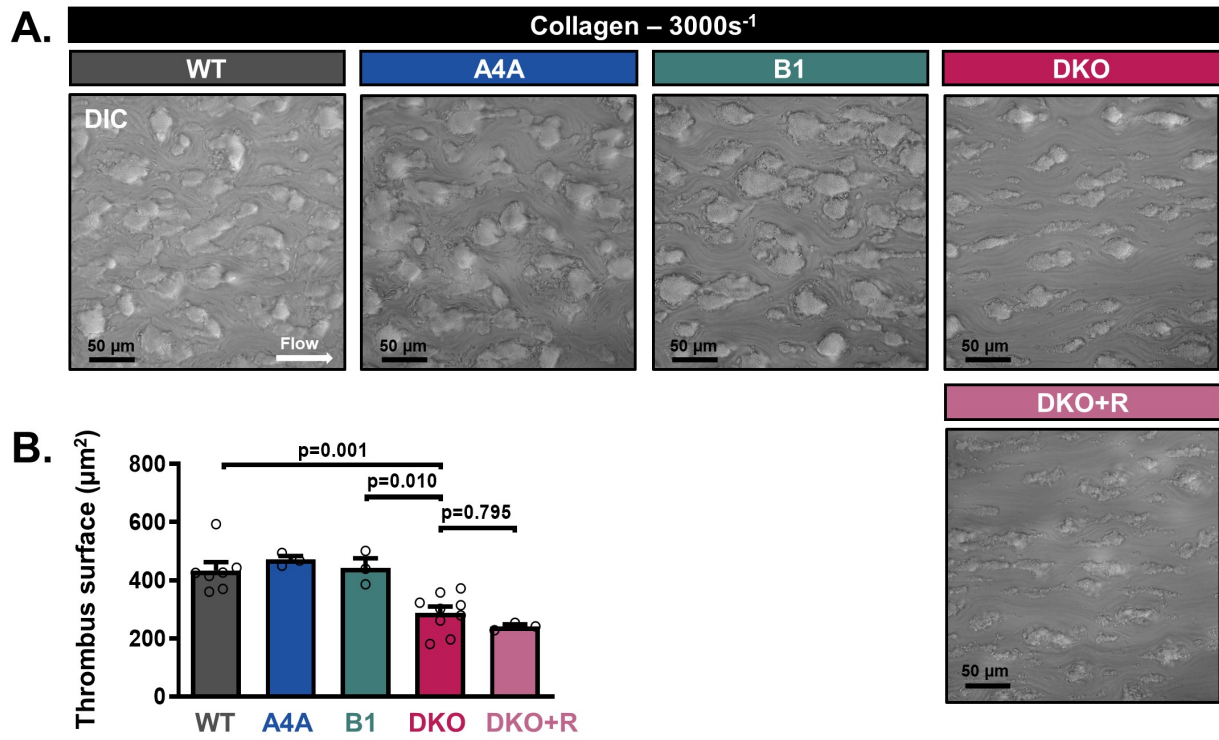


Figure 5

SUPPLEMENTAL:

Table of contents:

Supplemental methods – Page 2-7

Supplemental figures – Page 8-19

References – Page 20

Number of supplemental figures: 9.

Number of references: 11.

SUPPLEMENTAL METHODS:

Reagents: Polyclonal antisera against mouse/human α 4A-tubulin (pAb7621) ¹, and β 1-tubulin (pAb5274) were generated by immunizing rabbits against the peptides 76-DEIRNGPYR-84, and 428-VRAGLEDSEEDVEEA EVEAEEDKDH-451, respectively.

Mouse complete blood count: EDTA anti-coagulated blood was collected from the tail of anesthetized mice (by inhalation of isoflurane) and analyzed by impedancemetry using the Scil Vet ABC plus hematology analyzer (SCIL Animal Care Company, Altorf, France).

Platelet lifespan: Anesthetized mice (by inhalation of isoflurane) were injected retro-orbitally with 600 μ g of sulfo-NHS-LC-biotin (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) diluted in saline. At the indicated time points, EDTA-anticoagulated blood was collected from the tail of anesthetized mice (by inhalation of isoflurane) and processed for flow cytometry.

Platelet washing procedure: Mouse platelets were prepared as previously described ². Briefly, platelet rich plasma was obtained by centrifugation of ACD anti-coagulated blood. Platelets were isolated from the platelet rich plasma by centrifugation and washed twice in Tyrode's buffer containing 0.35% albumin and 0.5 μ M PGI₂ (Merck, Darmstadt, Germany). Platelets were finally resuspended at a final concentration of 3 or 2.10⁸ platelets/mL in Tyrode's buffer containing 0.35% albumin and 0.02 U/mL potato apyrase. Platelets were kept at 37°C for 10 min between each washing step and were allowed to rest for at least 30 min at 37°C before any experiments.

Transmission electron microscopy examination: The samples were prepared as previously described ¹. Whole femoral bone marrows and washed platelets were fixed with 2.5% glutaraldehyde and post-fixed with 1% osmium tetroxide. Fixed samples were dehydrated with ethanol and embedded in Epon resin. Transversal thin sections (100 nm) were then cut, mounted on 200-mesh thin-bar copper grids and subsequently contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Samples were examined at 120 kV under a Jeol 2100Plus TEM (FEI, Eindhoven, The Netherlands). For washed platelets, their shape (disc, oval and round) was manually assessed. For bone marrow sections,

megakaryocytes were manually counted on whole transversal sections and staged as previously described³.

Focused Ion-Beam Scanning Electron Microscopy (FIB-SEM): The samples were processed as previously described⁴. Briefly, washed platelets were fixed with 2.5% glutaraldehyde, incubated in 1.5% potassium ferrocyanide/1% osmium tetroxide and post-fixed with 1% osmium tetroxide. Fixed samples were dehydrated with ethanol and embedded in Epon resin. The blocks were mounted on SEM stubs, coated with platinum/palladium and examined under a Helios NanoLab dual beam microscope (FEI). Samples were milled with the FIB (30 kV, 2,5nA) at a thickness of 20nm per section and images were acquired in backscattering mode (3kV, 1,4nA). 3D reconstructions were obtained with Amira software (v.6.2, Thermofisher).

Platelet aggregation: Light-transmission aggregometry was performed at 37°C in an APACT 4004 aggregometer as previously described⁵. Briefly, washed platelets ($2 \cdot 10^5$ platelets/ μL) were stirred at 1,100 rpm and activated by the addition of either 0.5 μM ADP (Chrono-Log, Havertown, PA, USA) or 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Type I Horm collagen (Takeda, Konstanz, Germany) in presence of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ human fibrinogen (Grade L, Kabi, Stockholm, Sweden). Thrombin-induced aggregation (0.05 U/ mL) was performed with bovine thrombin (Merck) in the same conditions without added fibrinogen. The extent of aggregation was estimated with the APACT LPC Software.

Platelet immunofluorescence staining: PRP was isolated from citrated (0.32%) blood by centrifugation. It was diluted in PBS to reach a final concentration of $3 \cdot 10^5$ platelets/ μL , incubated for 20 min at 37°C, then fixed in warm 4% paraformaldehyde for an additional 20 min and cytospun onto poly-L-lysine coated slides. Fixed samples were permeabilized for 5 min with PBS-0.1% Triton X-100 and subsequently incubated with 1:150 Alexa488-coupled total α -tubulin antibody (clone DM1A, Sigma-Aldrich) in PBS supplemented with 1% Bovine Serum Albumin. Samples were washed thoroughly with PBS between each step and finally mounted in ProLongTM Gold Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific). For the taxol experiments, diluted PRPs were incubated for an additional 15 min with 10 μM Taxol (Sigma-Aldrich, T7402) or 0.1% DMSO before fixation. The samples were

examined under an inverted Leica DMI 4000B microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) and a 63x oil objective. Images were analyzed with the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

Western blotting: Protein analysis was performed as previously described ¹. Washed platelet in Tyrode's albumin buffer were washed twice in PBS supplemented with 0.5 μ M PGI₂, and lysed in Laemmli buffer containing 10 mM DTT. Proteins in boiled lysates (3.10⁶ platelets per lane) were separated by SDS-PAGE using 4-15% Criterion TGX gels (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories) with the Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories). Following a blocking step, membranes were successively incubated with primary antibodies (1:5000 anti- α -tubulin mouse monoclonal antibody (clone DM1A; Merck, Darmstadt, Germany); 1:1000 pAb7621 or 1:1500 pAb5274) overnight and with 1:20000 HRP conjugated-secondary antibodies (Jackson Immuno Research, PA, USA) for 2 h in TBS supplemented with 0.1% Tween 20 and 0.1% BSA. Membranes were revealed with Clarity ECL+ (Bio-Rad Laboratories) for 3 min and visualized with Chemidoc MP using the Biorad ImageLab Software (Bio-Rad Laboratories).

Direct enzyme-linked immunosorbent assays: Total tubulin. Tubulin ELISAs were performed as previously described ⁶. Platelet lysates were diluted in carbonate buffer (0.1 M, pH 9.6; Merck) and adsorbed overnight at 4°C onto 96 well ELISA plates (MaxiSorp, Starwell, Nunc; ThermoFisher Scientific). The plates were then washed in PBS-0.05% Tween 20, blocked with 200 μ L of PBS-0.05% Tween 20-1% BSA for 30 min at 37°C and incubated with 100 μ L of HRP-conjugated anti α -tubulin antibody (1:1000, DM1A clone, ab40742; Abcam, Cambridge, UK) diluted in PBS-0.05% Tween 20-0.1% BSA for 90 min at 37°C. After a washing step, the plates were then incubated with 100 μ L of OPD substrate (ThermoFisher Scientific) for 10 min to detect bound HRP-conjugated antibodies. The reaction was stopped with 50 μ L of 3 M HCl, and the optical densities were acquired at 490 nm. The results are expressed as the concentration (in fg) per single platelet, using a standard curve of purified pig brain tubulin (#T240, Cytoskeleton Inc, Denver, CO, USA). **Plasmatic VWF.** Plasmatic vWF ELISAs were performed on EDTA-anticoagulated platelet-poor plasma with the Mouse VWF/Von

Willebrand Factor (Sandwich ELISA) ELISA Kit (#LS-F22891; LSBio Inc., Seattle, WA, USA), following manufacturer's instructions.

Megakaryocyte culture: Total bone marrow cells were obtained by flushing freshly collected mouse femurs, tibiae and iliac crests into DMEM supplemented with 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine. Total cells were successively passed through 21- and 23-gauge needles, then washed and resuspended in PBS supplemented with 2 mM EDTA and 2 % fetal bovine serum (FBS). Lin- selection was subsequently performed according to the manufacturer's instructions (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada). Lin- cells were then washed and either processed for MEP/MKP analysis by flow cytometry or resuspended at $2 \cdot 10^6$ cells/mL in DMEM containing 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine, 10% FBS and 50 ng/ml TPO with addition of 100 U/mL hirudin for cell culture as described ⁷. Lin- cell were then seeded onto 12-well culture plates ($1.4 \cdot 10^6$ cells/well) and incubated at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere for up to 5 days. Ploidy analyses were performed by flow cytometry at the 3rd day of culture.

Flow cytometry procedures: All the analyses were performed on a BD LSRII or a Fortessa-X20 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) with the BD FACSDiva software (BD Biosciences). ***MEP/MKP analysis.*** Washed Lin- cells were labelled and analyzed as previously described ⁸. The Lin⁻ Sca-1⁻ CD16/32⁻ c-kit⁺ CD9⁺CD150⁺ population contains megakaryocyte precursors (MKP) while the Lin⁻ Sca-1⁻ CD16/32⁻ c-kit⁺CD9^{dim} CD150⁺ population contains megakaryocyte-erythroid progenitors (MEP). ***Ploidy analysis.*** At the 3rd day of culture, 1 µg/mL Hoechst 33342 was added to the cell suspension and left for 2.5 h in the incubator. Cells were then harvested, washed and incubated with 1:300 PeCy7-conjugated anti-CD41 (Clone MWReg30; eBioscience #25-04111-82) and 5 µg/mL Alexa488-conjugated anti-CD42c (clone RAM.1; EFS-Alsace) in PBS supplemented with 2% Newborn Calf Serum for 30 min. Labeled cells were subsequently stained with 2.5 µg/mL 7-AAD (Sigma-Aldrich) in PBS supplemented with 2% Newborn Calf Serum before analysis to assess cell viability. ***Glycoprotein surface expression.*** Hirudinated (100 U/mL) whole blood was first labelled with primary antibodies (10 µg/mL CD42b (clone RAM.6; EFS-Alsace), 10 µg/mL GPVI (clone JAQ1, Mo11-o; Emfret Analytics), 10 µg/mL GPIIb-IIIa (clone RAM.2; EFS-Alsace) or their corresponding isotypic

controls) in PBS supplemented with 10 mM Hepes, 1 mM EDTA and 150 mM NaCl (pH 7.6) for 30 min at room temperature. Cells were then pelleted by centrifugation, resuspended in PBS supplemented with 10 mM Hepes, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl (pH 7.6) and 10 µg/mL of Alexa488-coupled Goat anti-Rat antibody for an additional 30 min at room temperature in the dark. Samples were further diluted in 20 volumes of PBS supplemented with 10 mM Hepes, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl (pH 7.6) before analysis. *P-selectin exposure and fibrinogen binding.* Hirudinated whole blood (100 U/mL) or washed platelets ($1.10^4/\mu\text{L}$) were incubated with 1 U/mL bovine thrombin (Merck), 10 µg/mL CRP-XL (Cambcol Laboratories, Cambridgeshire, UK) or 1 mM Par4-activating peptide alone or in combination (Par4-activating peptide for whole blood, thrombin for washed platelets) in Tyrode's buffer containing FITC-coupled 1:20 P-selectin antibody (M130-1; Emfret Analytics, Eibelstadt, Germany) and 20 µg/mL Alexa647-coupled fibrinogen for 10 min at 37°C in the dark. Samples were further diluted in 20 volumes of warm Tyrode's buffer supplemented with 100 U/mL hirudin before analysis. For whole blood experiments, samples were also incubated with 2 µg/mL of anti-CD42c antibody to identify platelets (clone RAM.1; EFS-Alsace). *Platelet lifespan.* EDTA-anticoagulated (6 mM) whole blood from was incubated with streptavidin-PE and 2 µg/mL anti-CD42c antibody (clone RAM.1; EFS-Alsace) in PBS supplemented with 6 mM EDTA for 20 min at ambient temperature in the dark. Samples were further diluted in 20 volumes PBS supplemented with 6 mM EDTA before analysis.

Tail bleeding assay: Tails of anesthetized (by inhalation of isoflurane) 8-20 week old mice were amputated at their most distal part by 3 mm and immediately immersed in warm (37°C) isotonic 0.9% saline solution. Mice were considered as bleeders until the bleeding stopped for the first time. Bleeding was recorded until 30 min after tail amputation and the tail was cauterized if bleeding had not ceased.

Flow experiments: Microfluidic devices were made from poly-(dimethylsiloxane) (PDMS) by standard soft lithography techniques as previously described ⁹. *Flow on a collagen matrix.* The channels were coated with Type I Horm collagen (200 µg/mL) overnight at 4°C, and then passivated with 0.5 % human serum albumin in PBS for 30 min at ambient temperature. Hirudinated (100 U/mL) whole

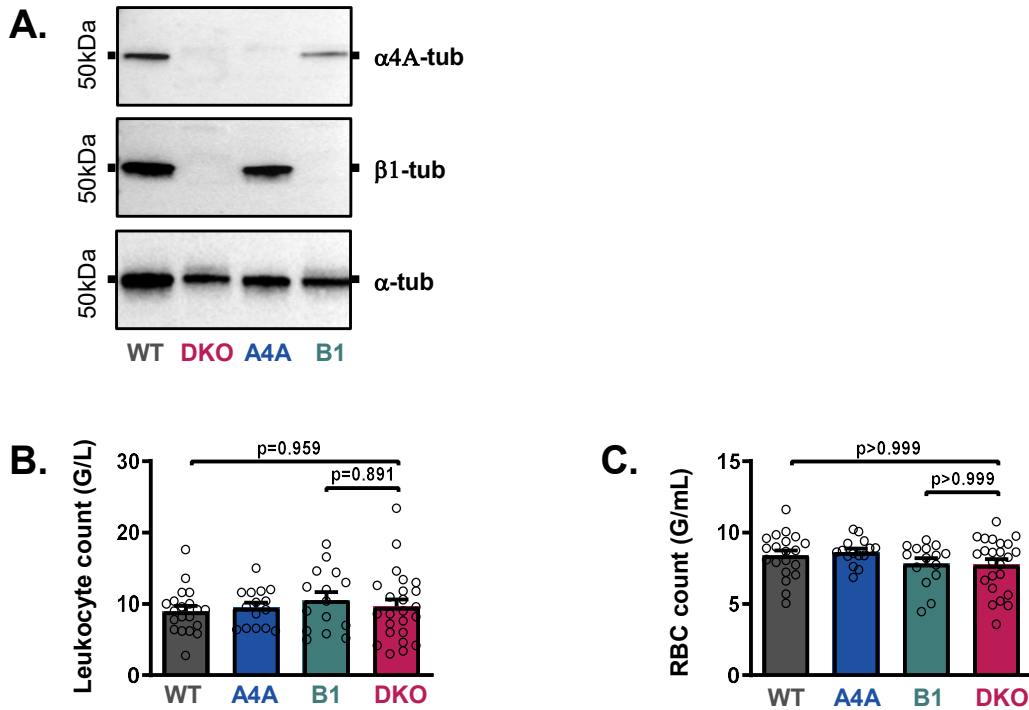
blood was then perfused at 37°C at the indicated wall shear-rate with a programmable syringe pump (PHD 2000, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). To assess phosphatidyl-serine exposure, the blood was first incubated with 1:100 of Alexa488-coupled Annexin-V (ThermoFisher Scientific) for 10 min in the dark before perfusion. *Flow on a VWF matrix.* The channels were fully-coated with 100 µg/mL of VWF-capturing peptide (vA3-III-23, Cambcol Laboratories, 100 µg/mL) overnight at 4°C, and then passivated with 0.5 % human serum albumin in PBS for 30 min at ambient temperature. Hirudinated (100 U/mL) whole blood was perfused at 37°C at the indicated wall shear-rate with a programmable syringe pump (PHD 2000, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Blood was flowed for 15 seconds to allow for the capture of the VWF from the plasma before recording the videos. Platelets were visualized using differential interference contrast (DIC) microscopy images obtained with an inverted Leica DMI 4000 B microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany: 40x, 1.4 numerical aperture oil lens). Data were recorded using a CMOS camera (ORCA-Flash4.0 LT, Hamamatsu, Massy, France and analyzed using ImageJ software (National Institutes of Health).

In vivo thrombosis: Ferric chloride-induced (FeCl₃) thrombosis was performed as previously described¹⁰. 8-12 week-old mice were anesthetized by intraperitoneal injection of Ketamine-Xylazine (K: 100 mg/kg, X: 10 mg/kg). Their circulating platelets were labeled by intra-jugular injection of 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DIOC6). Thrombosis was then induced by applying a 3 × 3 mm Whatman filter paper saturated with 7.5% FeCl₃ laterally to the carotid artery for 2.5 min. Thrombus formation was monitored in real time with a fluorescence microscope (Leica Microsystems, San Westlar, Germany) and a CCD (charge-coupled device) camera (CoolSNAP HQ2, Photometrics, Roper Scientific). Mice were kept at 37°C throughout the experiment. For scanning electron microscopy, the carotid arteries were fixed with 2.5% glutaraldehyde by transcatheter perfusion and excised within a 60 to 120 seconds time frame. They were subsequently fixed in 2.5% glutaraldehyde for an additional 24 hours. The samples were finally dehydrated with ethanol, dried with hexamethyldisilazane, sectioned lengthwise and sputtered with platinum palladium. They were examined under a Helios NanoLab dual beam microscope (FEI).

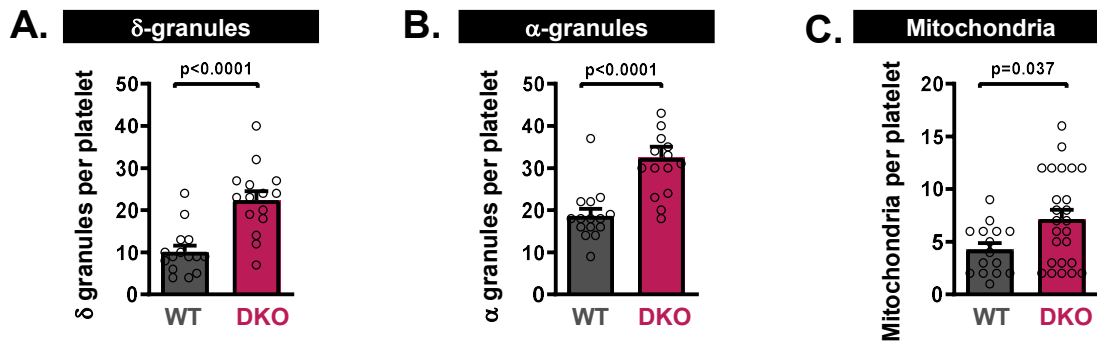
Venous thromboembolism: Collagen+adrenaline-induced venous thromboembolism was performed as previously described ¹¹. Briefly, 25 to 30 gram mice were anesthetized by intraperitoneal injection of Ketamine-Xylazine (K: 100 mg/kg, X: 10 mg/kg). A mixture of collagen (0.8 mg/kg) and adrenaline (60 µg/kg) was then injected into their exposed jugular vein, within an infusion time frame of 3-5 seconds. Mice survival was assessed over a 30 min, and those that were still alive after this time-period were sacrificed.

Statistical analyses: Results were expressed as the mean (\pm SEM) and statistical comparisons were performed as described in the figure legends. Normality and equality of variance were evaluated with a Shapiro-Wilk and a Bartlett's test, respectively.

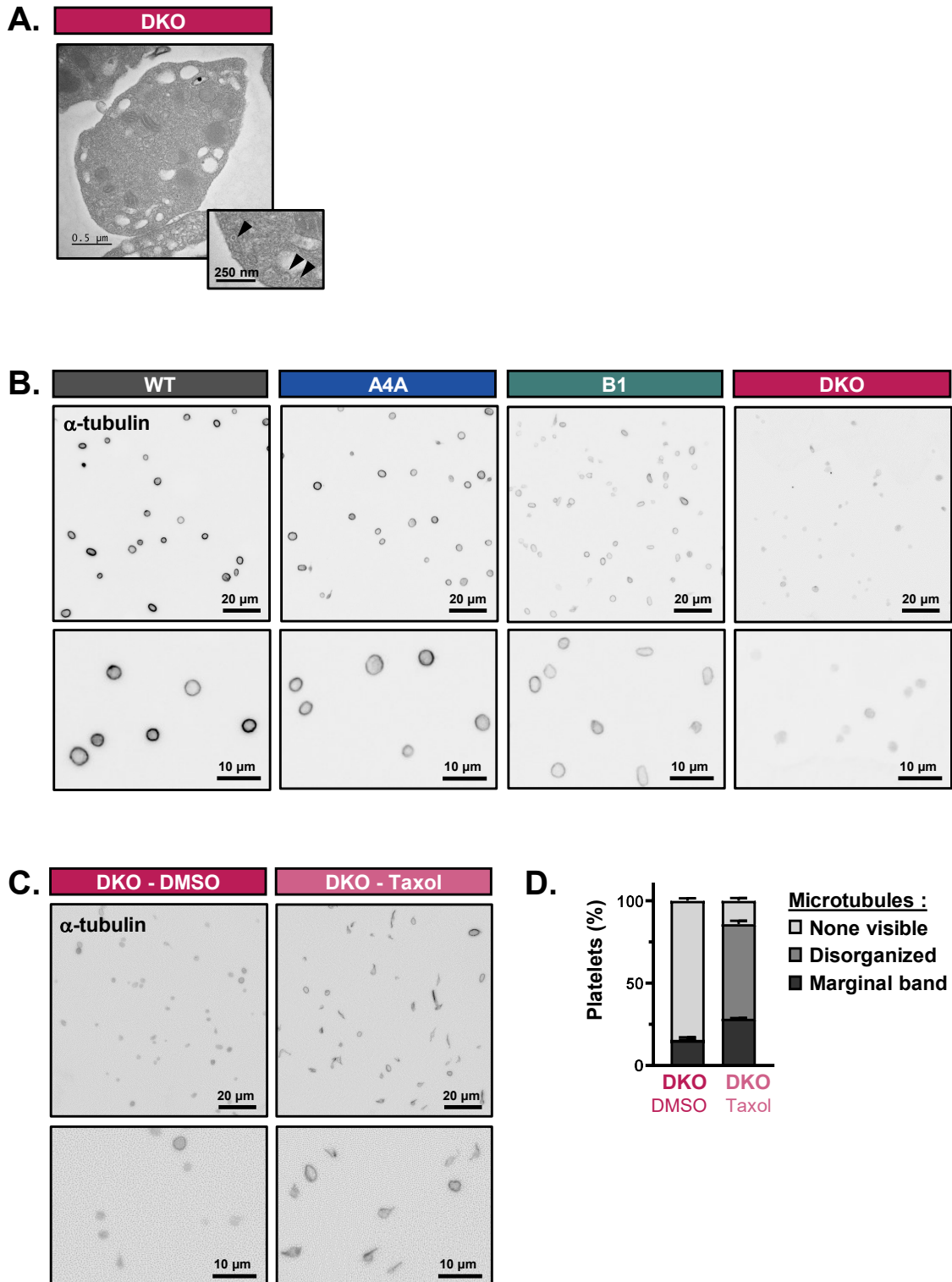
SUPPLEMENTAL FIGURES



Supplemental Figure 1. DKO are inactivated for $\alpha 4A$ - and $\beta 1$ -tubulin and have normal blood leukocyte and erythrocyte numbers. **A.** $\alpha 4A$ - and $\beta 1$ -tubulin content was estimated by western blotting using isotype specific antibodies in platelet lysates from WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1), DKO mice. Each sample ($3 \cdot 10^6$ platelets per lane) was deposited and blotted onto three separate membranes. Total α -tubulin was used as a loading control. **B.** Blood leukocyte counts of WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1), DKO mice. Results are expressed in G/L. Bar graph representing the mean \pm SEM. Each data point corresponds to an individual mouse. Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA followed by Tukey’s HSD post-hoc test. **C.** Blood erythrocyte counts of WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1), DKO mice. Results are expressed in G/mL. Bar graph representing the mean \pm SEM. Each symbol indicates an individual mouse. Statistical analysis was conducted by Kruskal-Wallis followed by Dunn’s post-hoc test.

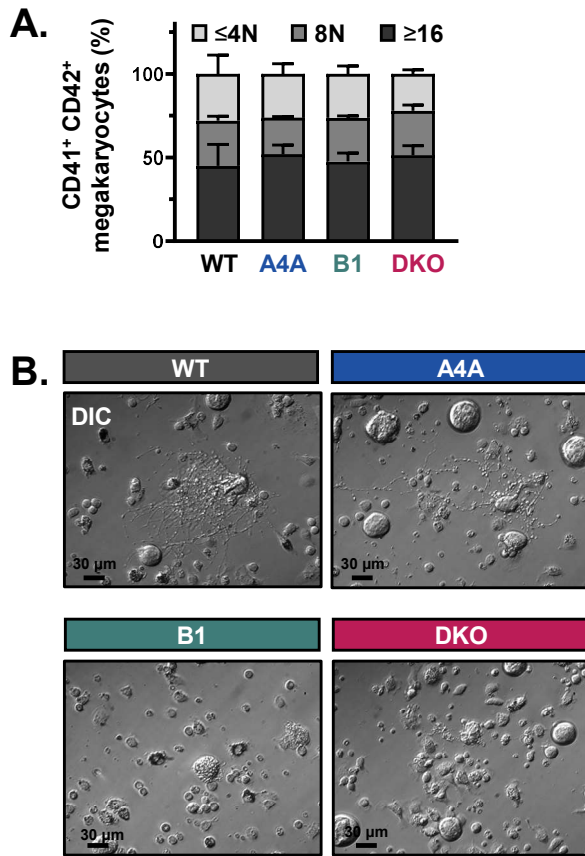


Supplemental Figure 2. Organelle quantification in WT and DKO washed platelets by Focused Ion-Beam Scanning Electron Microscopy (FIB-SEM). The number of **A.** Dense (δ) granules, **B.** Alpha (α) granules and **C.** Mitochondria per WT and DKO platelet was quantified. Each data point corresponds to an individual platelet. Statistical analysis was conducted by Mann Whitney test.

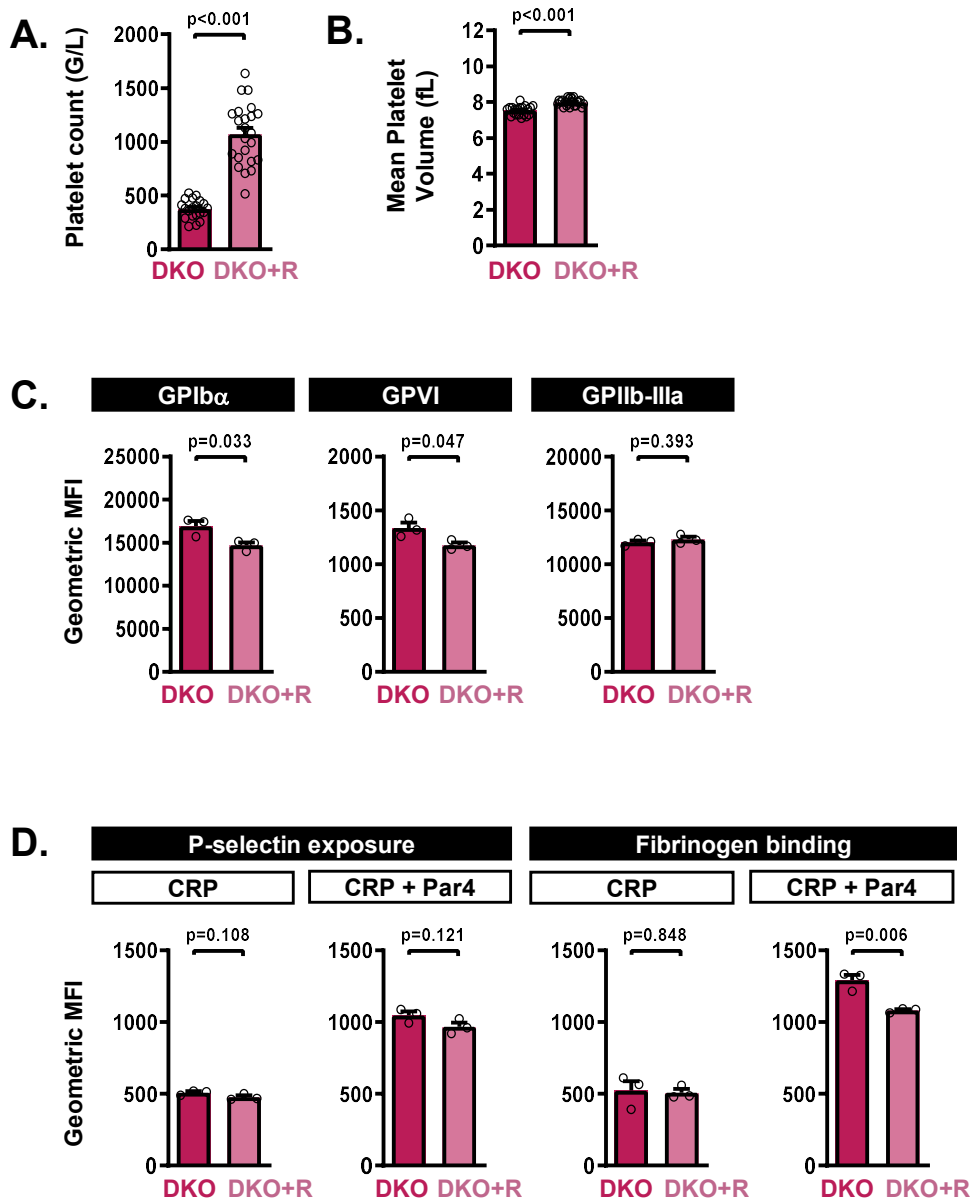


Supplemental Figure 3. Platelets inactivated for α_4 A- and β_1 -tubulin are devoid of marginal band. A. Representative transmission electron micrograph of a rare case of ovoid DKO platelet with

a visible cross-sectioned microtubule marginal band. Higher magnification is shown in the lower right corner insert, with microtubules indicated by black arrowheads. Scale bar = 0.5 μm , and 250 nm (lower right insert). **B.** Representative fluorescence micrographs of the microtubule cytoskeleton of WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1), DKO platelets (in citrated PRP). Microtubules were labeled with an antibody directed against total α -tubulin. Lower panel shows close-up views of individual platelets. Colors were inverted to better visualize microtubules. Scale bar = 20 μm (upper panel) and 10 μm (lower panel). **C.** Representative micrographs of the microtubule cytoskeleton of DKO platelets (in citrated PRP) incubated with 10 μM Taxol or 0.1% DMSO for 15 min prior to fixation. Microtubules were labeled with an antibody directed against total α -tubulin. Lower panel shows close-up views of individual platelets. Colors were inverted to better visualize microtubules. Scale bar = 20 μm (upper panel) and 10 μm (lower panel). **D.** Stacked bar graph representing the distribution of Taxol- and DMSO-treated DKO platelets (in citrated PRP) according to their microtubule cytoskeleton. Platelets were manually ranked based on the presence (marginal band or disorganized) or absence of visible microtubules. Results are expressed as % of each class. Bar graphs (stacked) represent the mean \pm SEM. N=3 per strain, with at least >100 platelets per individual preparation counted.



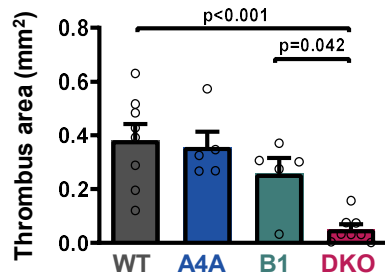
Supplemental Figure 4. Cultured megakaryocytes characterization. **A.** Flow cytometry analysis of the ploidy levels ($\leq 4N$, $8N$ or $\geq 16N$) of $CD41^+ CD42^+$ megakaryocytes obtained after 3 days of culture of WT, KOA_{4A} (A_{4A}), KOB₁ (B₁), DKO Lin- progenitors. Results are expressed as % of each class. Stacked bar graph representing the mean \pm SEM. N=3 for each strain. **B.** Representative DIC micrographs of megakaryocytes cultured for 4 days from WT, KOA_{4A} (A_{4A}), KOB₁ (B₁), DKO Lin- progenitors. N=3 for each strain. Scale bar = 30 μ m.



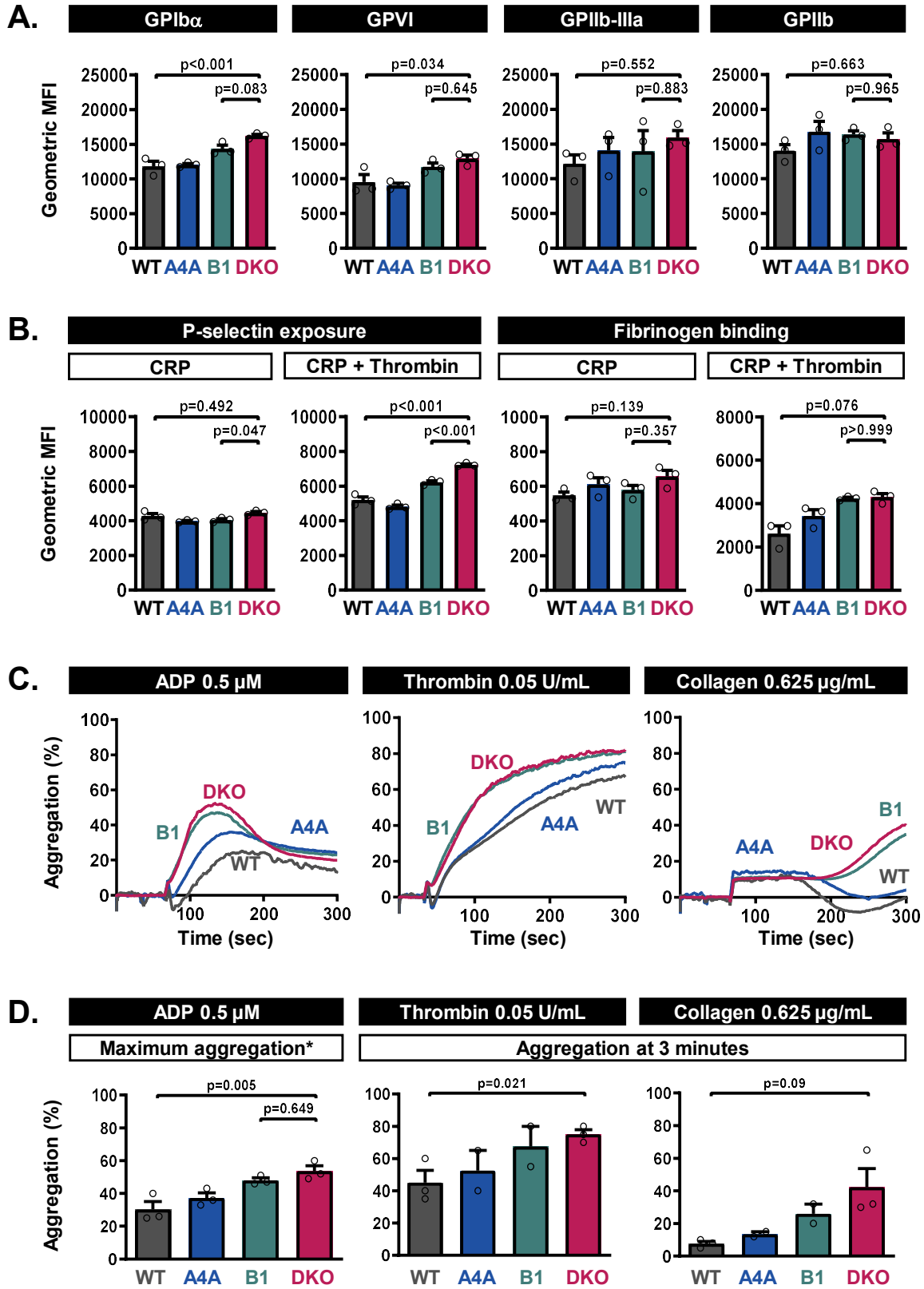
Supplemental Figure 5. Platelet activation remains unaffected after Romiplostim treatment.

A. Blood platelet counts of control (DKO) and romiplostim-treated DKO (DKO+R) mice. Mice were administered a single injection of saline or romiplostim (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 6 days prior to the analysis. Bar graphs represent the mean counts \pm SEM. Each symbol indicates an individual mouse. $N > 17$ per strain. Statistical analysis was conducted by unpaired two-tailed student's t-test. **B.** Mean platelet

volumes (MPV) of control (DKO) and romiplostim-treated DKO (DKO+R) mice. Results are expressed in fL. Bar graph representing the mean \pm SEM. Each data point corresponds to an individual mouse. Statistical analysis was conducted by unpaired two-tailed student's t-test. **C.** Flow cytometry analysis of platelet GPIb α , GPVI and GPIIb-IIIa surface expression of control (DKO) and romiplostim-treated DKO (DKO+R) mice as in A. Experiments were performed on hirudinated whole blood, and platelets were gated on their FSC and SSC parameters. Results are expressed as the geometric Mean Fluorescence Intensity (Geometric MFI) in arbitrary units (AU) of positive platelets. Bar graphs represent the mean \pm SEM. Each symbol indicates an individual experiment. N=3 per strain. Statistical analysis was conducted by unpaired two-tailed student's t-test. **D.** Flow cytometry analysis of platelet P-selectin exposure and fibrinogen binding in control (DKO) and romiplostim-treated (DKO+R) mice as in A following activation for 10 min at 37°C with CRP (10 μ g/mL) or a combination of CRP (10 μ g/mL) and Par4 (1 mM). Experiments were performed on hirudinated whole blood and platelets were gated on their CD42c positivity. Results are expressed as the geometric Mean Fluorescence Intensity (Geometric MFI) in arbitrary units (AU) of positive platelets. Bar graphs represent the mean \pm SEM. Each symbol indicates an individual experiment. N=3 per strain. Statistical analysis was conducted by unpaired two-tailed student's t-test.

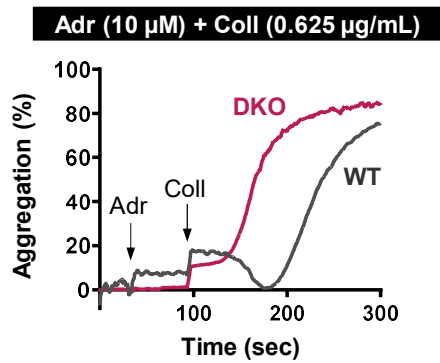


Supplemental Figure 6. Thrombus area quantification 14 min after topical application of ferric-chloride to the carotid artery of WT, KOA₄A (A4A), KOB₁ (B1), DKO mice. Bar graphs represent the mean \pm SEM. Each symbol indicates an individual mouse. N>5 for each strain. Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test.

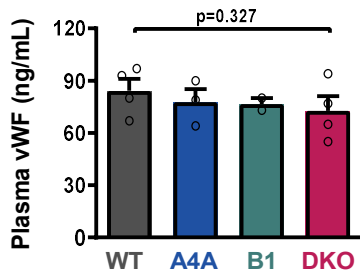


Supplemental Figure 7. Platelet activation and aggregation in low shear conditions are not impaired in DKO mice.

A. Flow cytometry analysis of GPIIb/IIIa, GPVI and GPIb-IX-V platelet surface expression in WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1), DKO mice. Experiments were performed on hirudinized whole blood, and platelets were gated based on FSC and SSC parameters. Results are expressed as the geometric Mean Fluorescence Intensity (Geometric MFI) in arbitrary units (AU) of positive platelets. Bar graphs represent the mean \pm SEM. Each symbol indicates an individual experiment. N=3 per strain. Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test. **B.** Flow cytometry analysis of P-selectin exposure and fibrinogen binding of WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1), DKO platelets following activation with CRP (10 μ g/mL) or a combination of CRP (10 μ g/mL) and thrombin (1 U/mL) for 10 min at 37°C. Experiments were performed on washed platelets, and platelets were gated by FSC and SSC. Results are expressed as the geometric Mean Fluorescence Intensity (Geometric MFI) in arbitrary units (AU) of positive platelets. Bar graphs represent the mean \pm SEM. Each symbol indicates an individual experiment. N=3 per strain. Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test. **C.** Representative light-transmission aggregation profiles of WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1), DKO washed platelets in response to low doses of ADP (0.5 μ M), thrombin (0.05 U/mL) or collagen (0.625 μ g/mL). Representative of 2 or more independent experiments. Results are expressed as % of light-transmission over time (in seconds). **D.** (Left) Maximum of aggregation observed for WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1), DKO washed platelets in response to a low concentration of ADP (0.5 μ M). (Middle and right) Aggregation levels after 3 min for WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1), DKO washed platelets in response to low concentrations of thrombin (0.05 U/mL) or collagen (0.625 μ g/mL). Results are expressed as % of light-transmission. Bar graphs represent the mean \pm SEM. Each symbol indicates an independent experiment. N=2-3 per strain. For the left panel, statistical analysis was conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test. For the middle and right panel, statistical analysis was conducted by unpaired two-tailed student's t-test.



Supplemental Figure 8. Representative light-transmission aggregation profiles of WT and DKO deficient washed platelets in response to the sequential addition of adrenaline (Adr, 10 μ M) followed by collagen (Coll, 0.625 μ g/mL). Results are expressed as % of light-transmission over time (in seconds).



Supplemental Figure 9. Plasma VWF levels are not affected in DKO mice. ELISA quantification of VWF in the plasma of WT, KOA4A (A4A), KOB1 (B1), DKO mice. Results are expressed in ng per mL. Bar graph representing the mean \pm SEM. Each data point corresponds to an individual plasma sample, obtained from a single mouse. N=2-4 per group. Statistical analysis of WT versus DKO data was conducted by unpaired two-tailed Student's unpaired t test.

Video 1. Focused Ion-Beam Scanning Electron Microscopy (FIB-SEM) acquisition and 3D reconstruction of (left) WT and (right) DKO washed platelets. For 3D reconstructions, platelet membranes are represented in light blue, α -granules in yellow, δ -granules in black and mitochondria in blue.

REFERENCES

1. Strassel C, Magiera MM, Dupuis A, et al. An essential role for α 4A-tubulin in platelet biogenesis. *Life Sci. alliance*. 2019;2(1):e201900309.
2. Cazenave J-P, Ohlmann P, Cassel D, et al. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol. Biol.* 2004;272(5):13–28.
3. Eckly A, Strassel C, Cazenave J-P, et al. Characterization of megakaryocyte development in the native bone marrow environment. *Methods Mol. Biol.* 2012;788:175–92.
4. Pertuy F, Eckly A, Weber J, et al. Myosin IIA is critical for organelle distribution and F-actin organization in megakaryocytes and platelets. *Blood*. 2014;123(8):1261–9.
5. Hechler B, Dupuis A, Mangin PH, Gachet C. Platelet preparation for function testing in the laboratory and clinic: Historical and practical aspects. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2019;3(4):615–625.
6. Kimmerlin Q, Dupuis A, Bodakuntla S, et al. Mutations in the most divergent α -tubulin iso-type, α 8-tubulin, cause defective platelet biogenesis. *J. Thromb. Haemost.* 2022;20(2):461–469.
7. Strassel C, Eckly A, Léon C, et al. Hirudin and heparin enable efficient megakaryocyte differentiation of mouse bone marrow progenitors. *Exp. Cell Res.* 2012;318(1):25–32.
8. Kimmerlin Q, Taviani M, Gachet C, Lanza F, Brouard N. Isolation of Mouse Megakaryocyte Progenitors. *J. Vis. Exp.* 2021;(171).
9. Receveur N, Nechipurenko D, Knapp Y, et al. Shear rate gradients promote a bi-phasic thrombus formation on weak adhesive proteins, such as fibrinogen in a VWF-dependent manner. *Haematologica*. 2020;105(10):2471–2483.
10. Janus-Bell E, Yakusheva A, Scandola C, et al. Characterization of the Role of Integrin α 5 β 1 in Platelet Function, Hemostasis, and Experimental Thrombosis. *Thromb. Haemost.* 2021.
11. Léon C, Freund M, Ravanat C, et al. Key role of the P2Y(1) receptor in tissue factor-induced thrombin-dependent acute thromboembolism: studies in P2Y(1)-knockout mice and mice treated with a P2Y(1) antagonist. *Circulation*. 2001;103(5):718–23.

C. Conclusion :

L'hypothèse initiale d'une collaboration fonctionnelle des deux isotypes α_4A et β_1 dans la lignée plaquettaire s'est confirmée. Les souris DKO souffrent ainsi d'une macrothrombopénie plus prononcée que les souris déficientes pour seulement la tubuline α_4A (KOA4A) ou KOB1. Les analyses de microscopie électronique à transmission ont par ailleurs montré que les plaquettes DKO sont totalement sphériques et dépourvues de bande marginale, un phénotype qui n'a jamais été décrit jusqu'ici chez la souris. Les plaquettes DKO contrastent ainsi nettement avec les plaquettes KOB1, qui sont plutôt ovoïdes et qui montrent toutes une bande marginale (bien que réduite) ainsi que les KOA4A, qui ne présentent curieusement aucun défaut. Les différences de phénotypes entre V260E et KOA4A sont aujourd'hui inexplicables. De plus, les souris DKO présentent de nets défauts de formation plaquettaire, plus sévère que les simples KO, pouvant par conséquent expliquer leur macrothrombopénie plus sévère. Les tubulines α_4A et β_1 coopèrent ainsi pour assurer la bonne maturation des mégacaryocytes et la morphologie discoïde des plaquettes en formant la bande marginale.

De façon surprenante, les souris DKO présentent une très forte tendance hémorragique par opposition aux simples KO, une tendance qui persiste même après avoir remonté leur numération plaquettaire à des valeurs physiologiques avec le Romiplostim. En plus du défaut d'hémostase, la réponse des souris DKO dans différents modèles de thrombose est aussi très impactée, notamment dans les cas i) d'une thrombose induite au chlorure de fer sur carotide, où les plaquettes DKO ne forment aucun thrombi (par opposition aux KOA4A et KOB1) et ; ii) d'une thrombose disséminée induite par l'injection d'un mélange pro-thrombotique dans la veine jugulaire qui provoque, par embolie pulmonaire, la mort de toutes les souris à l'exception des DKO. Pour mieux comprendre les causes et les mécanismes qui sous-tendent ces défauts, nous avons évalué les fonctions plaquettaires des DKO *in vitro*. Alors qu'aucun défaut n'est observé en conditions statiques, les plaquettes DKO montrent une forte réduction dans leur capacité à adhérer et agréger en présence de flux sur des matrices pro-thrombogènes de facteur Willebrand et collagène, respectivement. Pour réconcilier les observations et expliquer nos résultats, nous proposons que la forme sphérique des plaquettes DKO (à un degré jusque-là jamais décrit dans la littérature) soit à l'origine des défauts hémostatiques et thrombo-

tiques. Bien que nous ne l'ayons pas démontré, l'une des explications serait que leur géométrie atypique les empêcherait i) d'être correctement marginées par les érythrocytes vers les parois vasculaires et ; ii) d'adhérer fermement à l'endothélium lésé ou sur les premières couches de plaquettes. Pour ce deuxième point, les plaquettes DKO subirait notamment des forces de traînée et de portance plus importantes que leurs homologues WT, les empêchant par conséquent d'établir des points d'ancrage stables et de former correctement des thrombi. Nos résultats suggèrent l'implication directe de la forme des plaquettes dans leurs fonctions, un rôle longtemps suspecté mais encore jamais étayé par des données solides.

Projet 2

L'isotype de tubuline $\alpha 8$


A. Introduction :

L'isotype $\alpha 8$ est exprimé de manière ubiquitaire dans l'organisme et son rôle est encore très mal connu, à part une implication possible dans la spermatogenèse (Diggle et al., 2017). Dans la lignée plaquettaire, la tubuline $\alpha 8$ présente une expression croissante similaire à celle de la tubuline $\beta 1$ au cours de la mégacaryopoïèse. Par analogie avec l'isotype de tubuline $\alpha 4A$, qui partage ce même programme d'expression, nous avons alors pensé qu'il pourrait également exister des mutations dans le gène de cet isotype $\alpha 8$ pouvant causer des macrothrombopénies. Pour les identifier, nous avons bénéficié d'un projet conjointement mené par les EFS du Grand-Est, de Bretagne et du Centre-Pays de Loire, dont le but était d'explorer l'origine héréditaire de thrombopénies modérées non syndromiques dans une population de donneurs de sang. L'étude était motivée notamment par le fait qu'une large majorité de thrombopénies congénitales (qui peuvent augmenter le risque hémorragique), restent aujourd'hui sans étiologie génétique claire. Les individus furent recrutés sur la base d'une numération plaquettaire inférieure à $150.10^9/L$, puis inclus dans un programme de séquençage d'exomes pour un panel de gènes connus ou suspectés (dont le gène *TUBA8* encodant la tubuline $\alpha 8$) pour provoquer des thrombopénies (Guéguen et al., 2020). Parmi les 448 individus recrutés au cours de cette étude, 5 individus furent identifiés portant chacun une mutation ponctuelle distinctes dans *TUBA8* à l'état hétérozygote. En parallèle, un 6^{ème} individu présentant une macrothrombopénie congénitale fut indépendamment identifié par notre laboratoire, porteur hétérozygote d'une mutation ponctuelle dans *TUBA8*. Parmi les 6 individus, trois d'entre eux ont accepté d'être prélevés pour une étude plaquettaire plus approfondie. Les résultats seront présentés sous forme d'un Brief Report publié dans le *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, pour lequel je suis 1^{er} auteur.

B. Manuscrit publié :

BRIEF REPORT

Mutations in the most divergent α -tubulin isotype, $\alpha 8$ -tubulin, cause defective platelet biogenesis

Quentin Kimmerlin¹  | Arnaud Dupuis¹ | Satish Bodakuntla^{2,3,4} | Claire Weber¹ |
 Véronique Heim¹ | Véronique Henriot^{2,3} | Sylvie Moog¹ | Anita Eckly¹ |
 Paul Guéguen⁵ | Claude Ferec⁵ | Christian Gachet¹ | Carsten Janke^{2,3} | François Lanza¹

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Etablissement Français du Sang Grand Est, Unité Mixte de Recherche-S 1255, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

²Institut Curie, CNRS UMR3348, Paris-Sciences-et-Lettres Research University, Orsay, France

³CNRS UMR3348, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, Orsay, France

⁴Laboratory of Structural Cell Biology, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA

⁵Laboratoire de génétique moléculaire et d'histocompatibilité, Centre Hospitalier Régional et Universitaire Morvan, INSERM U1078, EFS Bretagne, Brest, France

Correspondence

François Lanza, UMR_S1255, EFS-Grand Est site de Strasbourg, 10 rue Spielmann, F-67065 Strasbourg Cedex, France.
 Email: francois.lanza@efs.sante.fr

Funding Information

This work was supported by the Université de Strasbourg, the Institut Curie, the Agence Nationale de la Recherche ANR-10-IDEX-0001-02, LabEx Cell(n)Scale ANR-11-LBX-0038, the grant ANR-17-CE13-0021. The Fondation pour la Recherche Médicale supported this work with the grants FDT202106013085 to QK, FDT201805005465 to SB, and DEQ20170336756 to CJ.

Abstract

Background: In the panel of genes commonly associated with inherited macrothrombocytopenia, an important fraction encodes key cytoskeletal proteins such as tubulin isotypes, the building blocks of microtubules. Macrothrombocytopenia-causing mutations have been identified in the *TUBB1* and *TUBA4A* genes, emphasizing their importance in the formation of platelets and their marginal band, a unique microtubule ring-like structure that supports the platelet typical disc-shaped morphology. This raised the hypothesis that other tubulin isotypes normally expressed in platelets could play a similar role in their formation.

Objectives: To assess whether tubulin isotype genes other than *TUBA4A* and *TUBB1* could be implicated in inherited macrothrombocytopenia.

Methods: We used high throughput sequencing to screen a cohort of 448 French blood donors with mild thrombocytopenia for mutations in a panel of selected genes known or suspected to be involved in platelet biogenesis.

Results: We identified six distinct novel mutations in *TUBA8*, which encodes the most-divergent α -tubulin, as the causative determinant of macrothrombocytopenia and platelet marginal band defects. Functionally, all *TUBA8* mutations were found to fully or partially inhibit the incorporation of the mutated $\alpha 8$ -tubulin in the microtubule network.

Conclusion: This study provides strong support for a key role of multiple tubulin genes in platelet biogenesis by discovering variants in a tubulin gene that was previously not known to be important for platelets.

KEYWORDS

blood platelets, microtubules, mutation, thrombocytopenia, tubulin

1 | INTRODUCTION

Inherited macrothrombocytopenia is characterized by decreased blood platelet counts and abnormally large platelets. In the panel of genes commonly associated with this condition, a significant proportion encode key cytoskeletal proteins such as myosin (e.g., *MYH9*),¹ actinin (e.g., *ACTN1*),² and tubulin (e.g., *TUBB1*).³ Macrothrombocytopenia-causing mutations have been identified in the *TUBB1* and *TUBA4A* genes,^{3,4} emphasizing their importance in the formation of platelets and their marginal band, a unique microtubule ring-like structure that supports the platelet-typical disc-shaped morphology. This raised the hypothesis that other tubulin isoforms normally expressed in platelets could play a similar role in their formation. Using a high-throughput sequencing approach, we discovered six novel *TUBA8* mutations in individuals with congenital macrothrombocytopenia and marginal band defects, pointing to a role of this α -tubulin isoform in platelet formation. This finding provides new insight into the role of the barely studied $\alpha 8$ -tubulin which, intriguingly, is the most divergent of the α -tubulin family.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Reagents

Polyclonal antiserum against mouse/human $\alpha 4A$ -tubulin (pAb7621),⁴ human $\alpha 8$ -tubulin (pAb7623), and $\beta 1$ -tubulin (pAb5275) were generated by immunizing rabbits against the peptide 76-DEIRNGPYR-84, 32-ADGTFDAQASKIND-45, and 431-VLEEDDEEVTEEAEMEPEDKGGH-451, respectively.

2.2 | Mutational analysis

A total of 448 blood donors were selected with a platelet count below 150 G/L. Their DNA was extracted from buccal swabs and 17 selected genes suspected to be implicated in thrombocytopenia, including *TUBA8*, were amplified by PCR using primers encompassing the coding sequences, intron-exon junctions, and 5' and 3' UTR (ABC study approved by ANSM-French agency for the safety of drugs and health products registered under n° IDRCB: 2014-A00002-45; informed consent was obtained for each individual).⁵ For Case 5 DNA was extracted from whole blood using a QiaAmp DNA kit (Qiagen©) and exons from 72 targeted genes (including *TUBB1*, *TUBA4A*, and *TUBA8*) were sequenced on a MySeq sequencer (Illumina) with a TruSeq Amplicon Custom Low Input Kit (designed with DesignStudio Software Illumina). Variant annotation was performed using SeqNext software (v4.4.0, JSI).

2.3 | Platelet washing procedure

Human washed platelets were prepared as previously described.⁶

Essentials

- Mutations in the *TUBA4A* and *TUBB1* tubulin genes cause inherited macrothrombocytopenia.
- High-throughput sequencing allowed a search for causative mutations in other tubulin genes.
- Mutations in *TUBA8* were identified in individuals with moderate macrothrombocytopenia.
- All identified mutations inhibit the incorporation of $\alpha 8$ -tubulin in the microtubule network.

2.4 | Transmission electron microscopy

Washed platelets were fixed with 2.5% glutaraldehyde, post-fixed with 1% osmium tetroxide, dehydrated with ethanol, and embedded in EPON resin. Then, transversal thin sections (100 nm) were cut, mounted on 200-mesh thin-bar copper grids, and subsequently contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Samples were examined at 120 kV under a CM120 TEM (FEI).

2.5 | Isolation and differentiation of human CD34⁺ cells into megakaryocytes

Human CD34⁺ cells were recovered and cultured as previously established.⁷

2.6 | Western blotting

Samples were carefully washed, lysed in Laemmli buffer containing 100 mM dithiothreitol, boiled, separated by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories) with the Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories). Following a blocking step, membranes were incubated with primary antibodies (anti- α -tubulin mouse monoclonal antibody, clone DM1A [1:5000, Merck], pAb7623 [1:1000], pAb7621 [1:1000], or pAb5275 [1:1500]) overnight and horseradish peroxidase (HRP) conjugated-secondary antibodies (Jackson Immuno Research) for 2 h in Tris-buffered saline supplemented with 0.1% Tween 20 and 0.1% bovine serum albumin (BSA). Membranes were revealed with Clarity ECL+ (Bio-Rad Laboratories) for 3 min and visualized with Chemidoc MP (Bio-Rad Laboratories). Quantification was performed by densitometry using the Image Lab software (Bio-Rad Laboratories).

2.7 | Immunostaining of cultured human megakaryocytes and washed platelets

The samples were fixed in 4% paraformaldehyde, cytospun onto poly-L-lysine coated slides, incubated with phosphate-buffered

saline (PBS) supplemented with 100 mM glycine and permeabilized in PBS-0.1% Triton X-100. They were subsequently blocked in PBS supplemented with 10% normal goat serum, 5% BSA, and 5% FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec). The samples were then incubated with 10 µg/ml of p7623 α 8-tubulin (IgG purified) or control rabbit IgG, followed by incubation with 4 µg/ml Alexa488-coupled goat anti-rabbit F(ab')₂ secondary antibody (Thermo Fisher Scientific) in combination with 1:150 Alexa647-coupled total α -tubulin antibody (clone DM1A; Sigma Aldrich). The samples were mounted in Mowiol (Thermo Fisher Scientific) and examined under a confocal Leica SP8 inverted microscope and a 63x oil objective. Images were analyzed with ImageJ software (National Institutes of Health).

2.8 | Direct enzyme-linked immunosorbent assay

Platelet lysates were diluted in carbonate buffer (0.1 M, pH 9.6; Merck) and adsorbed overnight at 4°C onto 96 well ELISA plates (MaxiSorp, Starwell, Nunc; Thermo Fisher Scientific). The plates were then washed in PBS-0.05% Tween20, blocked with 200 µL of PBS-0.05% Tween 20-1% BSA for 30 min at 37°C, and incubated with 100 µL of HRP-conjugated anti α -tubulin antibody (1:1000, DM1A clone, ab40742; Abcam) diluted in PBS-0.05% Tween 20-0.1% BSA for 90 min at 37°C. After a washing step, the plates were then incubated with 100 µL of OPD substrate (Thermo Fisher Scientific) for 10 min to detect bound HRP-conjugated antibodies. The reaction was stopped with 50 µL of 3 M HCl, and the optical densities were acquired at 490 nm. The results are expressed as the concentration (in fg) per single platelet, using a standard curve of purified pig brain tubulin (#T240, Cytoskeleton Inc.).

2.9 | TUBA8 mutagenesis, lentivirus production, and transduction

A codon-optimized, coding sequence of human *TUBA8* (accession number NM_018943.3; hTUBA8) was synthesized, cloned into pUC57, and subjected to quick-change site-directed PCR mutagenesis. hTUBA8 variants were then subcloned by sequence- and ligation-independent cloning into a pTRIP lentiviral vector downstream of the EF1- α promoter and green fluorescent protein (GFP) sequence.⁸ Each construct was verified by sequencing. Lentiviral particles were then produced as previously described⁹ and incubated with U2OS cells grown onto glass coverslips. After 48 h, transduced U2OS cells were processed for immunofluorescence microscopy as previously described.¹⁰

2.10 | Ethics statement

Human studies were performed according to the Declaration of Helsinki.

2.11 | Statistical analysis

Results were expressed as the mean (\pm standard error of the mean). Statistical comparisons were performed using one-way analysis of variance followed by Tukey-Kramer post hoc test.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

TUBA4A and *TUBB1* show increased transcript expression during megakaryocyte maturation.⁴ Here we confirmed this trend at the protein level and found that another tubulin isotype, *TUBA8*, follows the same dynamics (Figure 1A). In addition, this α 8-tubulin isotype is readily observed in the microtubule network of human cultured megakaryocytes and washed native platelets (Figure 1B). *TUBA8* (NM_018943.3) was therefore included in the panel of genes with potential implication in congenital macrothrombocytopenia.⁵ We performed high throughput sequencing in 448 French blood donors with mild thrombocytopenia and in a patient who was referred to us for a bleeding tendency and the presence of macroplatelets. Six point mutations were identified in *TUBA8* (c.59G>A, c.202A>C, c.640C>T, c.727C>T, c.868G>A, and c.958C>T) that resulted in six different single amino acid substitutions (p. Cys20Tyr, p. Ile68Leu, p. Arg214Cys, p. Arg243Cys, p. Glu290Lys, and p. Arg320Trp; Figure 1B,C). The platelet counts of the six individuals with *TUBA8* mutations ranged from 103 to 147 $\times 10^9/L$, and were thus at the lower limit of the normal values previously established in a control French adult population (171–397 $\times 10^9/L$).¹¹ When available, mean platelet volumes (MPV) ranged from 12.3 to 14 fL, clearly higher than the normal range (7.4–10.8 fL)¹¹ (Figure 1C). For the five blood donors (Cases 1–4 and 6), the defects are not accompanied by known bleeding manifestations, which is the case for most of the individuals reported with *TUBB1* mutations.³ In contrast, the patient with the p. Glu290Lys *TUBA8* (Case 5) had experienced bleeding episodes in the form of menorrhagia. Knowing that menorrhagia can occur independently of a low platelet count and might not be associated with the tubulin defect, this patient might carry other causing mutations that could not be identified by our sequencing gene panel. All the identified *TUBA8* mutations were confirmed by Sanger sequencing and were found to be monoallelic. Database search for common polymorphisms revealed frequencies ranging from 3 $\times 10^{-5}$ to 52 $\times 10^{-5}$ for five out of six *TUBA8* mutations, and no match for one *TUBA8* mutation (p. Cys20Tyr; Figure 1C). The mutated amino acid residues in the α 8-tubulin protein are conserved in every member of the α -tubulin family which, in light of the sequence divergence of α 8-tubulin, suggests an important structural or functional role in tubulins. To be noted, the donor with the p. Arg214Cys mutation (Case 3) was also found to carry a heterozygous c.436G>C mutation in the *TUBB1* gene, which resulted in the p. Gly146Arg amino acid substitution.

Two blood donors (Cases 3–4), and the patient (Case 5) became available for complementary platelet studies. Transmission

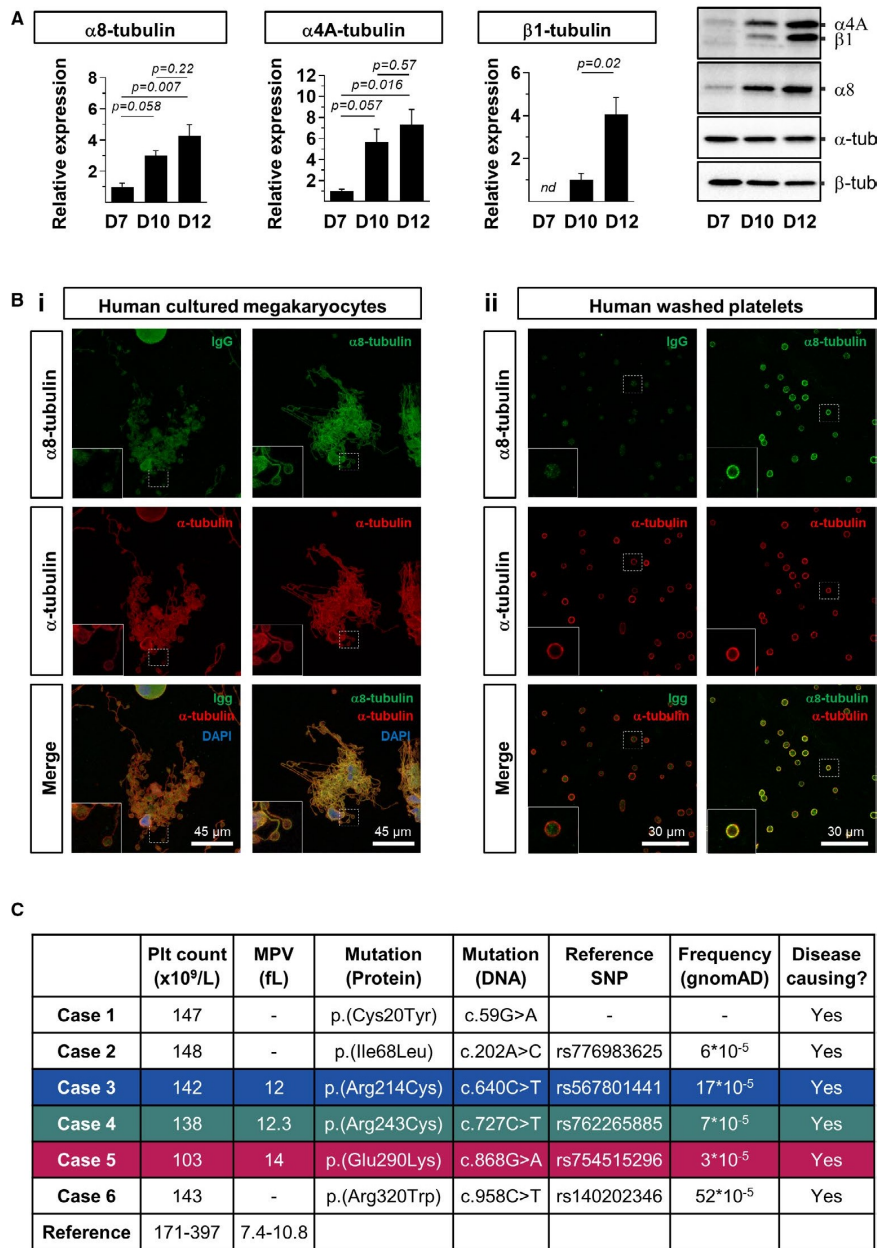


FIGURE 1 Mutations of *TUBA8* in individuals with moderate (macro)thrombocytopenia. **A**, Expression levels of $\alpha 8$ -, $\alpha 4A$ -, and $\beta 1$ -tubulin in human immature megakaryocytes (D7), mature megakaryocytes (D10), and proplatelet-forming megakaryocytes (D12), obtained in culture from CD34⁺ peripheral blood-derived hematopoietic progenitors. The levels of $\alpha 8$ -, $\alpha 4A$ -, and $\beta 1$ -tubulins were estimated by densitometry and normalized to those of total α -tubulin. Results are expressed as the mean \pm standard error of the mean of three independent experiments. Statistical analyses were performed by analysis of variance followed by Tukey post hoc test. **B**, Representative fluorescence micrographs (z-stack, 5 μ m) of $\alpha 8$ -tubulin containing microtubules (green) in human cultured megakaryocytes (i) and human washed platelets (ii). For each panel, the negative IgG control for $\alpha 8$ -tubulin is shown on the left. Microtubules were labelled separately for total α -tubulin (red) and merged images indicate colocalization (yellow). **C**, Main characteristics of the six individuals identified with *TUBA8* mutations. For each, the platelet count and mean platelet volume (MPV), the nucleotide and subsequent amino-acid substitutions, the single nucleotide polymorphism ID and frequency, and the disease-causing potential evaluated with the MutationTaster program are indicated

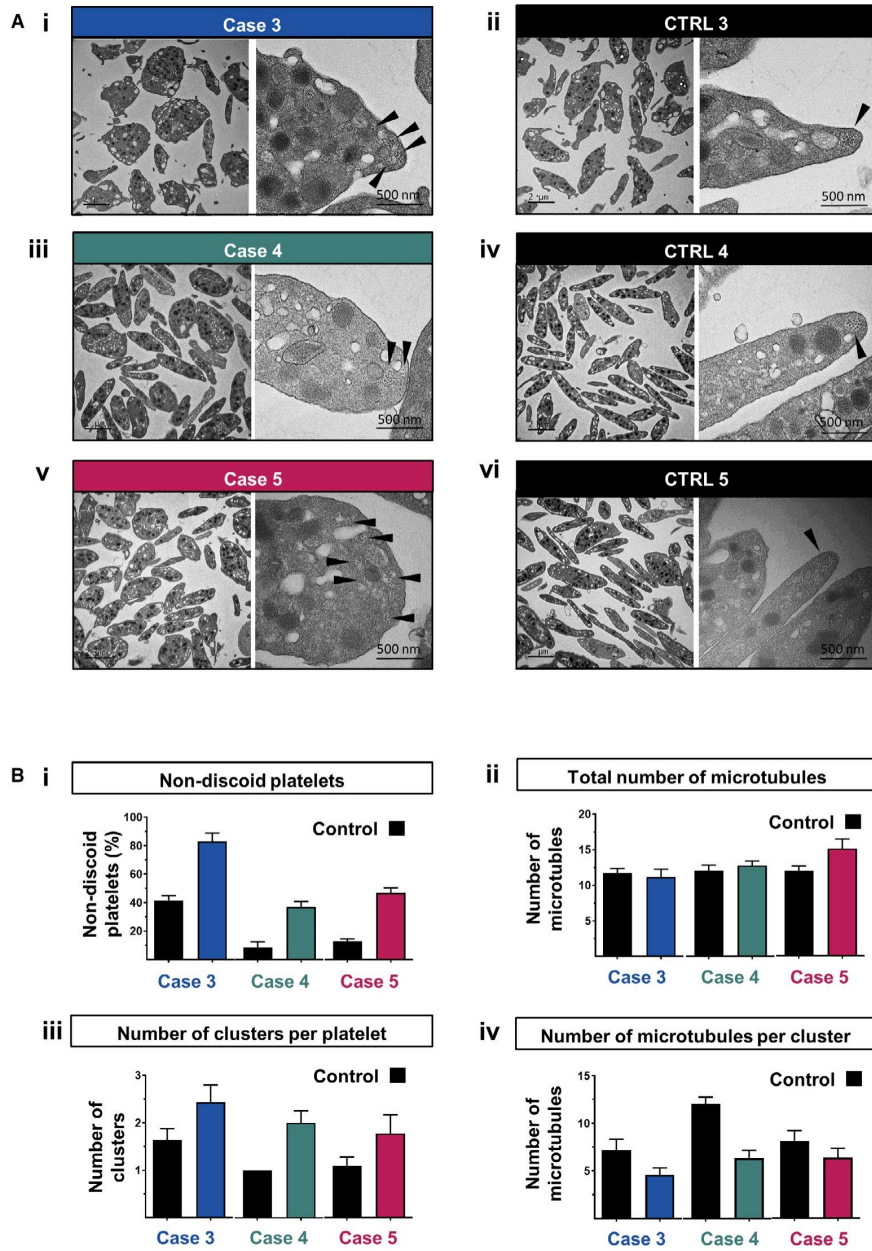


FIGURE 2 Platelet ultrastructural defects in individuals carrying *TUBA8* mutations. **A**, Representative transmission electron microscopy (TEM) micrographs of washed platelets obtained from the individuals carrying *TUBA8* p.R214C (i; Case 3), p.R243C (iii; Case 4), and p.E290K (v; Case 5) mutations and their respective controls (ii, iv, vi). In close-up views, the arrowheads indicate the multiple disorganized microtubule clusters in the *TUBA8* mutant platelets as opposed to the single cluster located at the platelet periphery for the controls. Please note that slight activation of the platelets of Case 3 and its control occurred during the washing procedure. **B**, Quantification of (i) the proportion of non-discoid platelets in the *TUBA8* mutant and control individuals. Platelet shape was scored as discoid and non-discoid from the analysis of TEM images. Results represent the mean \pm standard error of the mean (SEM) percentage from 85 to 129 randomly observed platelets; (ii) the total number of microtubules per platelet. For each platelet observed by TEM the number of individual microtubules was counted independent of their proximity. The results represent the mean \pm SEM of 7–15 individual platelets; (iii) the number of microtubule clusters per platelet. Microtubule clusters, illustrated by the arrowheads in (A), were numbered for each platelet analyzed in (ii). Values represent the mean \pm SEM from 7 to 15 individual platelets; (iv) the number of microtubules per cluster. For each platelet observed by TEM in (ii), the number of microtubules within each independent cluster was counted. The results represent the mean \pm SEM of 7–15 individual platelets

electron microscopy analyses of their platelets revealed similar abnormal features for the three individuals compared to their controls (Figure 2A). An abnormal round morphology was observed in 36% and 46% of Case 4 and Case 5 platelets, while only 8% and 12% of their respective control platelets presented this unusual shape. For Case 3, this round morphology was more frequent with 82% of non-discoid platelets, but was also observed for 41% of the respective control platelets (Figure 2Bi). This is likely to be caused by slight platelet activation during the preparation of Case 3 and its control platelets, because shape change represents one of the

most sensitive platelet responses. In addition to their abnormal morphology, platelets of the three individuals showed a severe disorganization of the normally well-structured marginal band. While the total number of microtubules in the marginal bands was similar to that in their respective control (Figure 2Bii), they adopted a scattered distribution with distinct clusters of closely associated microtubules (Figure 2Ai,iii,v-Biii). This stands in strong contrast to control platelets, which typically show a single cluster of microtubules in their submembranous space in transversal sections (Figure 2Aii,iv,vi-Biii). The number of microtubules per

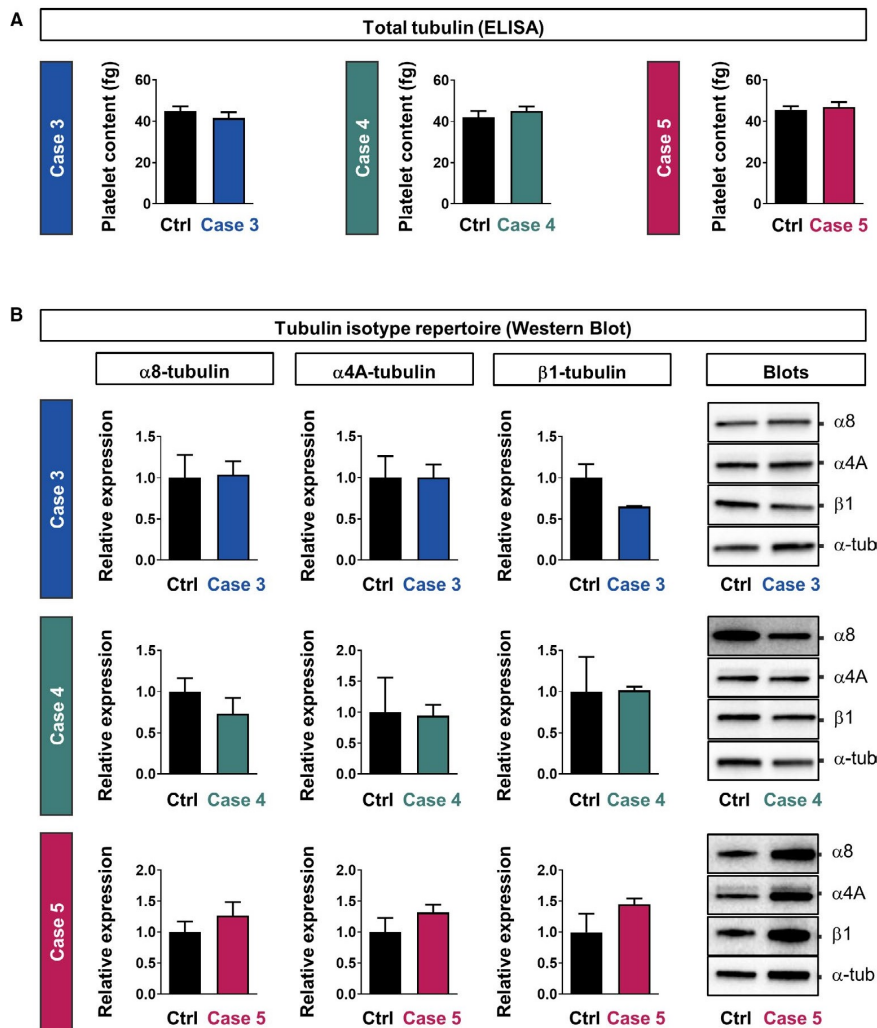
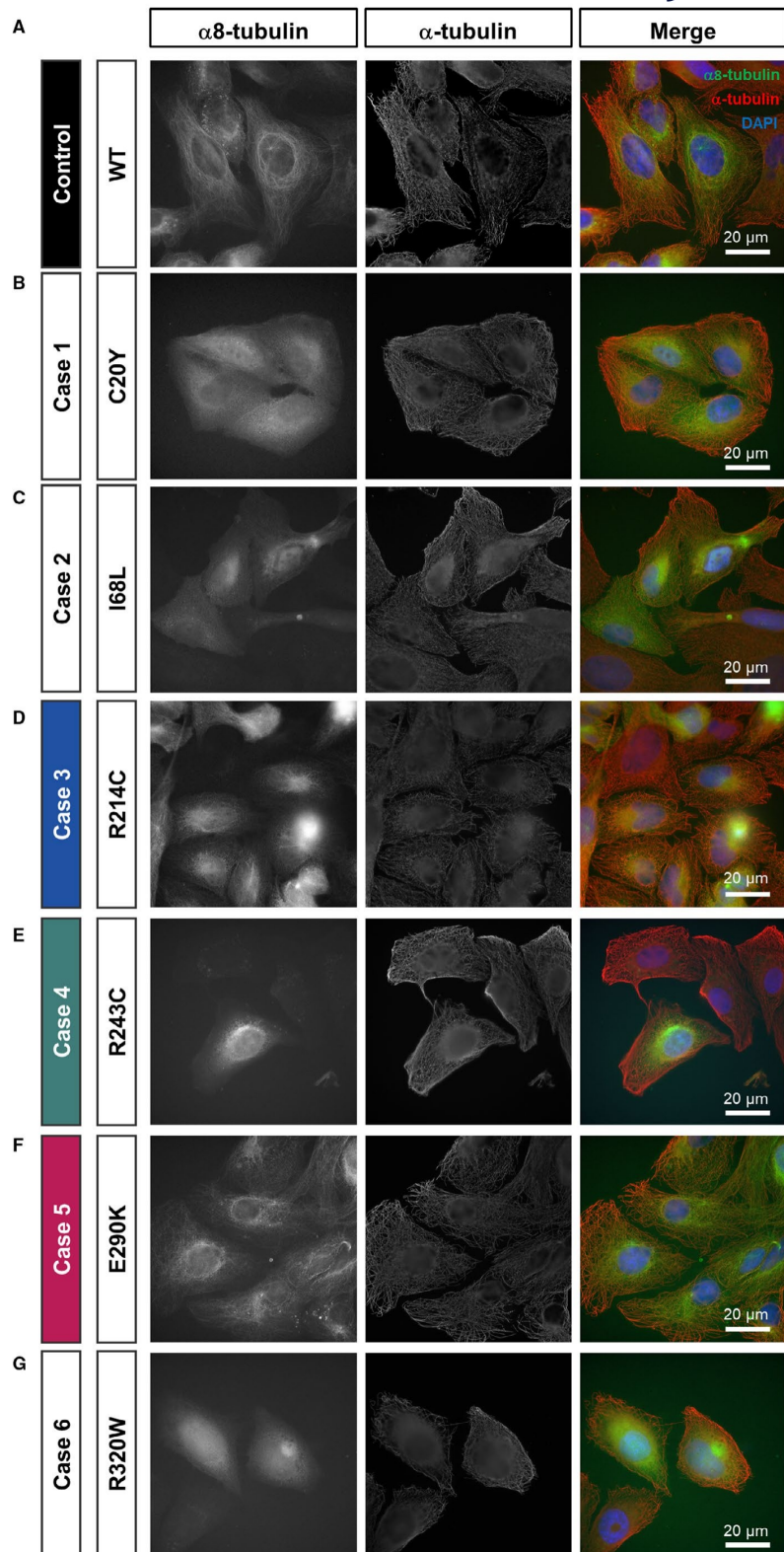


FIGURE 3 Platelet tubulin content in individuals carrying *TUBA8* mutations. A, Quantification by ELISA of the total α -tubulin content in the platelets of the individuals carrying the *TUBA8* p.R214C (Case 3), the p.R243C (Case 4), or the p.E290K (Case 5) mutations and the respective controls. The results are expressed as the concentration (in fg) per single platelet and represent the mean of 3 technical replicates. B, Estimation by western blot of the levels of α 8-, α 4A-, and β 1-tubulin in the platelets of the individuals carrying the *TUBA8* p.R214C (Case 3), the p.R243C (Case 4), or the p.E290K (Case 5) mutations and the respective controls. The expression levels for each isotype, estimated by densitometry, have been normalized to those of total α -tubulin, and the ratio arbitrarily set to 1 for each control sample. Results are expressed as the mean \pm standard error of the mean of three technical replicates

FIGURE 4 Effect of the *TUBA8* mutations on their expression and incorporation into microtubules. A, Representative fluorescence micrographs of U2OS cells expressing wild-type N-terminally green fluorescent protein (GFP)-tagged *TUBA8*. B–G, Representative fluorescence micrographs of U2OS cells expressing mutant p.C20Y, p.I68L, p.R214C (Case 3), p.R243C (Case 4), p.E290K (Case 5), or p.R320W N-terminally GFP-tagged *TUBA8*. For each condition, microtubules were labelled separately and nuclei were counterstained with DAPI



cluster was therefore diminished in the platelets of the three individuals (Figure 2Biv). Together with the macrothrombocytopenia, these results thus indicate that $\alpha 8$ -tubulin is both important for platelet biogenesis and for the organization of the marginal band and the subsequent platelet shape.

We then proceeded in functional evaluation of the platelets for the three individuals. The levels of the two main functional receptors, $\alpha \text{IIb}\beta 3$ integrin (GPIIb-IIIa) and GPIb, were found to be increased by about 20%–80% (data not shown). This increase is most likely more due to the increased platelet size than to an increased level of activation.^{12,13} Furthermore, p-selectin exposure at the platelet surface in response to the thrombin receptor activating peptide agonist, as well as platelet aggregation in response to a series of agonists, were similar to their respective controls for all three individuals (data not shown). These data therefore indicate that $\alpha 8$ -tubulin, while important for normal platelet production, is not required to sustain the main platelet functions as measured *in vitro*. To evaluate whether the defects in marginal band formation resulted from critically low levels of tubulin, which would impede proper microtubule assembly, we estimated tubulin levels in platelet lysates. The total α -tubulin content was equivalent to the control in the three individuals (Figure 3A). We then evaluated the level of $\alpha 8$ -tubulin relative to total α -tubulin. The $\alpha 8/\alpha \text{tot}$ ratio represented 103%, 73%, and 126% of control for Case 3, Case 4, and Case 5, respectively (Figure 3B). This suggested that the *TUBA8* p. Arg243Cys mutation in Case 4 had a negative effect on the expression or stability of the $\alpha 8$ -isotype in platelets whereas it appeared to be preserved in Cases 3 and 4. In addition, we found that the expression of $\alpha 4A$ - and $\beta 1$ -tubulin were not decreased in the platelets of the three individuals, with the exception of $\beta 1$ -tubulin, which represented 65% of control for Case 3 (Figure 3B). This could be linked to the additional heterozygous *TUBB1* p. Gly146Arg mutation found in this individual. Together, these data suggest that different consequences on the expression and stability of $\alpha 8$ -tubulin might be expected depending on the type of mutation in the six identified individuals.

To understand the mechanism underlying the platelet defects, we evaluated whether the mutant forms of $\alpha 8$ -tubulin can incorporate into microtubules. For this, we transduced the human cell line U2OS with lentivirus encoding the $\alpha 8$ -tubulin variants that are N-terminally tagged with GFP. Following transduction of wild-type $\alpha 8$ -tubulin, a GFP-positive network was observed in all the cells that colocalized with microtubules labelled with an anti-tubulin antibody, indicating incorporation into the cellular microtubules (Figure 4A). A similar, but weaker microtubule localization was also observed with the $\alpha 8$ -tubulin mutations from Case 3 (p. Arg214Cys) and Case 5 (p. Glu290Lys; Figure 4D,F). In contrast, $\alpha 8$ -tubulin variants p. Cys20Tyr, p. Ile68Leu, p. Arg243Cys (Case 4), and p. Arg320Trp did not visibly incorporate into microtubules, and instead showed a diffuse or punctuated labelling (Figure 4B,C,E,G). These results indicate that all six *TUBA8* mutations inhibit, though to variable degrees, their incorporation into

the microtubule network. Such an abnormal incorporation could similarly occur in platelets and affect marginal band formation by directly disrupting its assembly or stability, or indirectly via defective interaction with microtubule-associated proteins involved in its maintenance.

In conclusion, this study provides strong support for a key role of multiple tubulin genes in platelet biogenesis by discovering variants in a tubulin gene that was previously not known to be important for platelets: *TUBA8*. Characterizing platelets from patients carrying these variants provided insight into the role of the divergent and barely studied $\alpha 8$ -tubulin isotype, representing overall another contribution highlighting the relevance of the tubulin code for controlling specialized cellular functions, such as platelet biogenesis. Before its identification in megakaryocytes,⁴ expression of *TUBA8* had been reported in heart, skeletal muscle, testis, and brain;¹⁴ however, little was so far known about its physiological importance. Compared to other tubulin gene variants, *TUBA8* variants were rarely found in brain disorders,¹⁵ and the so-far unique reported case also carries a mutation in *SNAP29*, which prevents a direct conclusion on the role of the *TUBA8* variant in this case.¹⁶ The present report therefore presents the first occurrence of an abnormal biological process directly linked to *TUBA8* mutations. Finally, although patients with platelet tubulinopathies do not classically exhibit bleeding problems, the example of Case 5 reported here raises the possibility that tubulin-related defects could contribute to an increased bleeding in association with another phenotype modifier, as previously documented for *TUBB1*,¹⁷ justifying the current high throughput sequencing programs focusing on hereditary thrombocytopenia.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the individuals involved in this study; members of EFS-Grand Est, EFS-Nouvelle Aquitaine, EFS-Bretagne, EFS-Centre Pays de la Loire, for their participation in the ABCT study; Dr, Dominique Desprez for organizing Case 4 and Case 5 blood sampling; Joëlle Dulong, Dr, Benoit Guillet, Nadine Bouvet for organizing Case 3 blood sampling and platelet preparation.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to disclose.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Q.K. performed platelet and cell biology studies, analyzed data, and co-wrote the paper; A.D. co-designed the ABCT study, organized the clinical part, and collected biological and sequencing data; C.W. and P.G. performed and analyzed molecular experiments; V. Hei. and S.M. performed platelet studies; A.E. performed electron microscopy studies; V. Hen. and S.B. performed molecular biology experiments; S.B. performed transduction and immunofluorescence experiments; C.F. and C.G. organized the clinical study and contributed to intellectual input; C.J. analyzed the data and critically reviewed the paper; F.L. designed the study, analyzed the data, and wrote the paper.

ORCID

Quentin Kimmerlin  <https://orcid.org/0000-0002-1999-782X>

REFERENCES

1. Savoia A, De Rocco D, Pecci A. MYH9 gene mutations associated with bleeding. *Platelets*. 2017;28:312-315.
2. Westbury SK, Shoemark DK, Mumford AD. ACTN1 variants associated with thrombocytopenia. *Platelets*. 2017;28:625-627.
3. Burley K, Westbury SK, Mumford AD. TUBB1 variants and human platelet traits. *Platelets*. 2018;29:209-211.
4. Strassel C, Magiera MM, Dupuis A, et al. An essential role for α 4A-tubulin in platelet biogenesis. *Life Sci Alliance*. 2019;2:1-13.
5. Guéguen P, Dupuis A, Py JY, et al. Pathogenic and likely pathogenic variants in at least five genes account for approximately 3% of mild isolated nonsyndromic thrombocytopenia. *Transfusion*. 2020;60:2419-2431.
6. Cazenave JP, Ohlmann P, Cassel D, Eckly A, Hechler B, Gachet C. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol Biol*. 2004;272:13-28.
7. Strassel C, Brouard N, Mallo L, et al. Aryl hydrocarbon receptor-dependent enrichment of a megakaryocytic precursor with a high potential to produce proplatelets. *Blood*. 2016;127:2231-2240.
8. Jeong JY, Yim HS, Ryu JY, et al. One-step sequence-and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics Studies. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78:5440-5443.
9. Bodakuntla S, Janke C, Magiera MM. Knocking out multiple genes in cultured primary neurons to study tubulin posttranslational modifications. *Methods Mol Biol*. 2020;2101:327-351.
10. Bell PB, Safiejko-Mroccka B. Improved methods for preserving macromolecular structures and visualizing them by fluorescence and scanning electron microscopy. *Scanning Microsc*. 1995;9:843-857: discussion 858-860.
11. Troussard X, Vol S, Cornet E, et al. Determination of full blood count normal reference values for adults in France. *Ann Biol Clin*. 2014;72:561-581.
12. Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, et al. ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet*. 2013;92:431-438.
13. Kunishima S, Kashiwagi H, Otsu M, et al. Heterozygous ITGA2B R995W mutation inducing constitutive activation of the α IIb β 3 receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood*. 2011;117(20):5479-5484.
14. Stanchi F, Corso V, Scannapieco P, et al. TUBA8: A new tissue-specific isoform of α -tubulin that is highly conserved in human and mouse. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;270:1111-1118.
15. Chakraborti S, Natarajan K, Curiel J, Janke C, Liu J. The emerging role of the tubulin code: From the tubulin molecule to neuronal function and disease. *Cytoskeleton*. 2016;73:521-550.
16. Diggle CP, Martinez-Garay I, Molnar Z, et al. A tubulin alpha 8 mouse knockout model indicates a likely role in spermatogenesis but not in brain development. *PLoS One*. 2017;12:e0174264.
17. Guillet B, Bayart S, Pillois X, Nurden P, Caen JP, Nurden AT. A Glanzmann thrombasthenia family associated with a TUBB1-related macrothrombocytopenia. *J Thromb Haemost*. 2019;17:2211-2215.

How to cite this article: Kimmerlin Q, Dupuis A, Bodakuntla S, et al. Mutations in the most divergent α -tubulin isotype, α 8-tubulin, cause defective platelet biogenesis. *J Thromb Haemost*. 2022;20:461-469. doi:[10.1111/jth.15573](https://doi.org/10.1111/jth.15573)

C. Conclusion :

Tout comme pour l'isotype $\alpha 4A$, il existe bel et bien dans la population des mutations dans le gène *TUBA8* de la tubuline $\alpha 8$ pouvant causer une macrothrombopénie. Malgré la petite cohorte de 448 donneurs, 5 individus étaient porteurs hétérozygotes d'une mutation ponctuelle de type faux-sens dans la tubuline $\alpha 8$, témoignant d'une fréquence étonnamment élevée et proche de celle de la tubuline $\beta 1$ (9 individus retrouvés dans cette même cohorte). Il est à noter qu'aucun d'eux ne portait de mutations supplémentaires dans la sélection de gènes connus pour être impliqué dans la biogenèse des plaquettes (Guéguen et al., 2020), à l'exception d'un donneur qui portait en plus une mutation dans le gène *TUBB1* codant la tubuline $\beta 1$. Par microscopie électronique à transmission, nous avons observé qu'une large fraction de leurs plaquettes ont perdu leur profil discoïde caractéristique au profit d'une forme ovoïde. Bien que le nombre d'enroulements total de microtubules soit normal, leur bande marginale est systématiquement désorganisée. Elle prend l'apparence de plusieurs petits faisceaux composés de 3 à 5 microtubules éparpillés aux pôles plaquettaires. Les bandes marginales des plaquettes mutées contrastent ainsi fortement avec celles des plaquettes contrôles, qui s'organisent quant à elles typiquement en un faisceau unique de 10 à 15 microtubules. Les fonctions plaquettaires, évaluées en agrégation par turbidimétrie, ne semblent pas affectées par cette anomalie structurale. Bien que nous n'ayons pas pu directement étudier la mégacaryopoïèse, ces données suggèrent que la tubuline $\alpha 8$ soit effectivement impliquée dans la formation des plaquettes et l'organisation de la bande marginale chez l'Homme. Elle n'est à l'inverse pas indispensable pour leurs fonctions.

Pour comprendre les effets délétères de ces mutations et les distinguer de simples polymorphismes, nous avons introduit les formes mutées de cet isotype (fusionnées à la GFP) dans une lignée cellulaire par transduction virale. Dans tous les cas, les mutations bloquent partiellement ou totalement l'incorporation des tubulines $\alpha 8$ mutées dans leurs réseaux de microtubule respectifs, contrairement à la forme normale non-mutée qui s'incorpore correctement dans les polymères. Nous formulons ainsi l'hypothèse, sur la base de ces données, que les tubulines $\alpha 8$ mutées ne s'incorporent plus, non plus, dans les microtubules de la lignée plaquettaire, perturbant ainsi leur dynamique soit i) directement,

car l'isotype $\alpha 8$ est suspecté pour conférer des propriétés intrinsèques pro-stabilisantes aux polymères ; ou ii) indirectement par l'intermédiaire d'une interaction perturbée avec des MAPs impliquées dans la formation de la bande marginale. Les mécanismes exacts conduisant à ce phénotype restent encore inconnus.

Projet 3

Les modifications post-traductionnelles de la tubuline

A. Introduction :

Les modifications post-traductionnelles de tubuline les plus fréquemment rencontrées dans les cellules sont i) l'acétylation de la lysine K40 des tubulines α ; ii) la détyrosination des tubulines α , qui se rapporte au retrait de leur tyrosine C-terminale et ; iii) la glutamylation et la glycylation des tubulines α et β , qui consistent en l'ajout de chaînes latérales de glutamate ou de glycine, respectivement. Dans la lignée plaquettaire, ces modifications sont dans l'ensemble très peu étudiées. Nous ne connaissons ni leur cinétique d'apparition au cours de la mégacaryopoïèse et de la thrombopoïèse, ni leurs proportions relatives dans les mégacaryocytes et les plaquettes. Par conséquent, leurs rôles restent pour la plupart encore hypothétiques, mis à part l'acétylation qui semble dispensable pour la formation et les fonctions des plaquettes. Dans ce travail, nous avons d'abord cherché à caractériser biochimiquement le répertoire des modifications post-traductionnelles de tubuline au cours de la biogenèse des plaquettes, qui manquait à mon arrivée au laboratoire, et qui constitue la base pour ensuite aiguiller nos analyses fonctionnelles. Pour ceci, nous avons utilisé un système de culture de mégacaryocytes humains obtenus à partir de progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺. Il permet de distinguer plusieurs intermédiaires de maturation, depuis le progéniteur jusqu'aux plaquettes, garantissant ainsi une analyse fine de la cinétique de différenciation. Nous avons quantifié, au niveau transcriptionnel par qRT-PCR, l'apparition des transcrits de toutes les enzymes impliquées dans ces modifications. En parallèle, nous avons suivi les modifications au niveau protéique par Western Blot, que nous avons comparées à celles bien connues du cerveau et des testicules de souris, où elles sont très présentes et jouent des rôles clés. Les résultats de cette caractérisation sont présentés sous forme d'un manuscrit en préparation qui n'est toutefois pas terminé car nous souhaiterions l'accompagner de données fonctionnelles réalisées chez la souris (en cours de génération au laboratoire).

B. Manuscrit en préparation :

TITLE: Inventory of the tubulin post-translational modifications during platelet biogenesis

AUTHORS: Quentin Kimmerlin¹, Sylvie Moog¹, Ivan Bieche^{2,3}, Carsten Janke^{4,5}, and François Lanza¹

AFFILIATIONS OF INSTITUTIONS: ¹ Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S1255, FMTS, Strasbourg, France. ²Institut Curie, Department of Genetics, Paris, France. ³Université de Paris, Paris, France. ⁴ Institut Curie, PSL Research University, CNRS UMR3348, Orsay, France. ⁵ Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, CNRS UMR3348, Orsay, France

CORRESPONDING AUTHOR: François Lanza at UMR_S1255, EFS-Grand Est site de Strasbourg, 10 rue Spielmann, F-67065 Strasbourg Cedex, France; Phone: +33 388 21 25 25; Fax: +33 388 21 25 21; E-mail: francois.lanza@efs.sante.fr

ABSTRACT

Microtubule functions are controlled via the precise and timely regulation of their building blocks, the tubulin isotypes, in combination with several post-translational modifications (PTMs). While some tubulin isotypes are known to be crucial for platelet biogenesis (TUBB1, TUBA4A, TUBA8), the temporal regulation and biological significance of their PTMs remain mostly unknown. This project aims to characterize the evolution of tubulin PTMs in platelet biogenesis and to identify those that could be functionally relevant for this process. To this end, the profiles of tubulin PTMs were analyzed by Western Blot in human CD34⁺-derived cultured megakaryocytes and platelets, and human blood-derived platelets. For reference, they were compared to those in brain and testis. In addition, the transcripts of the enzymes involved in their establishment and removal was followed by qRT-PCR. Our results show that tubulin acetylation remained stable along megakaryocyte maturation, despite a concomitant rise in the levels of the deacetylase *HDAC6* transcript. Tubulin detyrosination progressively increased as megakaryocytes differentiated, in line with the increasing levels of the detyrosinase *VASH1* transcript. Interestingly, polyglutamylation of α -tubulins accumulated and reached its highest expression in platelets. Polyglutamylation of β -tubulins, in contrast, followed the inverse trend and became undetectable in platelets. This pattern of polyglutamylation could be related to the high transcript expression found for *TTL5*, the α -tubulin polyglutamylase, and for the *CCP1* and *CCP5* deglutamylases. Finally, tubulin polyglycylation was strikingly detected in the form of long chains, despite a weak transcriptional expression of the sole known polyglycylyase *TTL10*. Together, these results provide the first comprehensive characterization of the tubulin PTM repertoire in the platelet lineage, thus laying the ground for insightful evaluation of their respective role in platelet formation.

INTRODUCTION

Microtubules are hollow polymers involved in a broad range of cellular functions ¹. Their functional diversity is thought to be controlled by specific combinations of tubulin isotypes and tubulin post-translational modifications (PTMs), a concept known as the tubulin code ². In spite of the considerable effort made over the last decade, the importance of the tubulin code still remains largely unexplored in many cell types. Blood platelets are small non-nucleated cellular fragments that prevent and stop hemorrhages and that harbor very specialized microtubules, for which our knowledge of the tubulin code is currently very limited ^{3,4}. They are produced in the bone marrow by large polyploid cells known as megakaryocytes, which differentiate from hematopoietic stem cells through megakaryopoiesis ⁵. This process is characterized by multiple cycles of endomitosis, the expansion of an intracellular membrane network and the formation of platelet specialized granules. It culminates in the formation of cytoplasmic protrusions called proplatelets, which elongate in the bone marrow sinusoids and fragment into platelets in the downstream microcirculation. The last events of platelet formation comprise the formation of the marginal band, an architectural singularity essential to maintain the platelet disc-shaped morphology that appear as an annular sub-membranous structure composed of 8-12 microtubules ^{6,7}. Remarkably, microtubules are involved in each step of platelet biogenesis, however, the nature and importance of the tubulin code has yet to be fully evaluated. Two tubulin isotypes, α 4A- and β 1-tubulin, have been identified from studies in mutant mice and patients as being crucial for platelet formation and marginal band assembly ^{8,9}. In contrast, the contribution of tubulin PTMs in this process remains poorly understood.

Tubulin acetylation, detyrosination, polyglutamylation and polyglycylation are currently considered as the main PTMs of functional relevance. Tubulin acetylation occurs at lysine 40 of α -tubulins, and is thought to confer mechanical resistance and increased microtubule stability ^{10,11}. It has been observed in megakaryocytes but seems however dispensable for platelet production, as both the mice deficient for the main platelet acetylase aTAT1 or deacetylase HDAC6 display near-normal phenotypes. Tubulin detyrosination also occurs on α -tubulins and consists in the removal of their genetically-encoded C-terminal tyrosine residue by the recently identified SVBP/VASH carboxypeptidase complex, a process reversed by the TTL enzyme. It is notably involved in the regulation of motor-

proteins, myocyte contractility and neuronal cargo trafficking, but its function in the platelet lineage remains to be assessed. Tubulin polyglutamylation and polyglycylation are much more complex by comparison to the previous PTMs. They involve both the α - and the β -tubulins, and consist in the addition of glutamate- or glycine-based side chains in their C-terminal tails. This reaction is catalyzed by the TTLL family of enzymes, while deglutamylation is performed by the CCP enzymes and deglycylation by another, still unknown set of enzymes. Tubulin polyglutamylation and polyglycylation are crucial for neuronal development¹²⁻¹⁵ and cilia biogenesis¹⁶⁻¹⁸, respectively. In platelet biogenesis, tubulin polyglutamylation has been proposed to participate in the formation of proplatelet-like structures in a CHO cell model that express a mutant form of the platelet-restricted α IIb β 3 integrin¹⁹. More recently, tubulin polyglutamylation and polyglycylation were both observed in the proplatelets of iPSC-derived mature megakaryocytes²⁰.

To date, the current knowledge still remains sparse and fails to clearly establish the roles of tubulin PTMs in platelet formation. In fact, the complexity of tubulin PTMs in combination with the lack of a proper characterization considerably restrains functional studies in the platelet lineage. To address this question, we devised a study to characterize the tubulin PTM repertoire in platelet biogenesis in human CD34⁺-derived cultured megakaryocytes and platelets. In particular, we first followed by qRT-PCR the transcripts of every known enzyme involved in the tubulin PTMs, at several defined stages of megakaryocyte differentiation all the way to the mature platelets. We then assessed the levels of the respective PTMs at the protein level by Western Blot with a panel of specific antibodies, also at defined maturation stages, that we put in regards to those of brain and testis lysates, two well-characterized tissues where tubulin PTMs have important functions. Altogether, these results provide the first comprehensive characterization of tubulin PTMs in differentiating megakaryocytes and platelets, thus laying the ground for insightful evaluation of their functional implication in platelet formation.

MATERIAL AND METHODS

Isolation of human CD34⁺ cells. Human CD34⁺ cells were recovered as previously described from leukodepletion filters obtained from the Établissement Français du Sang – Grand Est ²¹. Briefly, cells retained by these filters were recovered with PBS supplemented with 10% acid-citrate-dextrose and 5% fetal bovine serum. They were sequentially mixed with 2% Dextran, allowed to rest for 30 minutes to remove any contaminating erythrocytes, layered onto Lymphoprep and centrifuged at 400 g for 30 minutes. Mononuclear cells were subsequently recovered from the medium interface, washed in PBS supplemented with 2m M EDTA and subjected to CD34⁺ immunomagnetic sorting (CD34 MicroBead Kit UltraPure, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. Purity was assessed by flow cytometry and usually reached 90% with 95% viability. After isolation, CD34⁺ cells were quickly frozen in 10% DMSO and kept for a maximum of 6 months in liquid nitrogen.

Differentiation of CD34⁺ progenitor cells into megakaryocytes. CD34⁺ cells were cultured and differentiated into megakaryocytes using an optimized 2-step protocol as previously established ²¹. Cells were quickly thawed and washed in PBS supplemented with 20% Fetal Bovine Serum. They were first seeded into T25 flasks at a density of 20 000 cells per cm² in SFEM Stemspan (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada) supplemented with 1% PSG (Stem-cell Technologies), 20 µg/mL LDL (Stemcell Technologies), 1X CC220 cytokine cocktail (Stem-cell Technologies) and 1 µM Stemregenin1 (Stemcell Technologies) and incubated at 37°C with 5% CO₂ for 7 days. At the end of the 7-day period, cells were harvested, reseeded into T75 flasks at a density of 30 000 cells per cm² in SFEM supplemented with 1% PSG, 20 µg/mL LDL, 50 ng/mL TPO (Stemcell Technologies) and 1 µM Stemregenin1 and incubated for another 5 days at 37°C with 5% CO₂. For quality control purposes, each culture was analyzed at days 7, 10 and 12 by flow cytometry with anti-CD41 and CD42c antibodies and yielded around 90% CD41⁺CD42c⁺ cells at the end of the protocol. For Western Blot analysis, cells were harvested at days 7, 10 and 12 and processed as described below. For RNA extraction and qRT-PCR, cells were harvested at days 0, 4, 7, 10 and 12 and processed as described below. For cultured platelet isolation, cells were harvested at day 13 and processed as described below.

Blood-derived platelet washing procedure. Human blood-derived washed platelets were prepared as previously described ²². Briefly, platelet rich plasma was obtained by centrifugation of ACD anti-coagulated blood (1 volume of ACD for 6 volumes of blood) collected from the forearm vein of volunteer donors. Platelets were isolated from the platelet rich plasma by centrifugation, washed twice in Tyrode's buffer containing 0.35% albumin and 0.5 μ M PGI₂ and resuspended at a final concentration of 3.10^8 platelets/mL in Tyrode's buffer containing 0.35% albumin and 0.02 U/mL potato apyrase. Platelets were kept at 37°C for 10 minutes between each washing step and were allowed to rest for at least 30 minutes at 37°C before being processed for Western Blot analysis.

Culture-derived platelet washing procedure. Human culture-derived platelets were prepared using a protocol adapted from a published procedure ²². At day 13, cultured platelets were harvested by successive pipetting of the medium as described previously ²³. The cell suspension was subsequently diluted in Tyrode's Albumin and washed twice in the presence of 3.3 ng/mL Iloprost by centrifugation at 250 g and 2000 g, respectively. Washed culture-derived platelets were then centrifuged at 2000g and resuspended at a concentration of 3.10^8 platelets/mL in Tyrode's Albumin containing 0.02 U/mL potato apyrase. Culture-derived platelets were kept at 37°C for 10 minutes between each washing step and were allowed to rest for at least 30 minutes at 37°C before being processed for Western Blot analysis.

RNA extraction and qRT-PCR. RNA was extracted using the RNeasy® Mini kit (QIAGEN) following manufacturer's instructions. qRT-PCR was performed as described elsewhere ²⁴ with the PCR primers listed in table 1. Each experiment was performed in triplicate. Values were normalized using the *Tbp* (TATA Binding Protein) transcript as a reference using the $\Delta\Delta$ ct method.

Western blotting. Donor-derived and cultured washed platelets were washed twice in PBS supplemented with 0.5 μ M PGI₂ and lysed in Laemmli buffer 1X containing 100mM DTT. Platelets were kept at 37°C for 10 minutes between each washing step before lysis. Cultured megakaryocytes were washed twice in PBS by centrifugation and lysed in Laemmli buffer 1X containing 100mM DTT. Platelet and megakaryocyte lysates were then boiled, separated by SDS-PAGE using 10% acrylamide

gels specifically designed to separate α and β -tubulins²⁵ and subsequently transferred onto nitrocellulose membranes with the Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Following the blocking step, membranes were sequentially incubated with primary antibodies overnight and secondary antibodies for 2 hours in TBS supplemented with 0.1% Tween and 0.1% bovine serum albumin. Membranes were washed thoroughly between each step. The antibodies used in this study are listed in table 2. Membranes were then incubated with Clarity ECL+ (Bio-Rad Laboratories) for 3 minutes, transferred into a hybridization bag, allowed to rest for 15 minutes and visualized with Chemi-doc MP (Bio-Rad Laboratories). Quantification was performed by densitometry using the Biorad ImageLab Software (Bio-Rad Laboratories).

Ethics statement. Human studies were performed according to Helsinki declaration. Human blood samples and leukodepletion filters were obtained from volunteer blood donors who gave their written informed consent and were recruited by the Établissement Français du Sang-Grand Est.

Statistical analysis. Results were expressed as the mean (\pm SEM). Statistical comparisons were performed using one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer post-hoc test. Normality and equality of variance were systematically verified with the Shapiro-Wilk test and the Levene's test, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

To study the functional relevance of tubulin PTMs, it is essential to have prior knowledge with regards to their nature and behavior in the cells of interest. This prerequisite is currently lacking in the platelet lineage which, together with the extreme complexity of tubulin PTMs, likely explains the scarcity of data in this particular lineage. To address this fundamental point, we devised a study to characterize the main tubulin PTMs at the transcriptional and proteomic levels throughout megakaryopoiesis, from the early progenitors all the way to mature platelets. For this, we first analyzed the transcripts of the enzymes involved in tubulin PTMs by qRT-PCR in human CD34⁺-derived cultured megakaryocytes²¹. The entire repertoire of enzymes involved in tubulin acetylation, detyrosination, polyglutamylation and polyglycylation was thoroughly analyzed at several defined stages that correspond to CD34⁺ progenitors (D0), differentiating megakaryocyte progenitors (D4), immature megakaryocytes (D7), mature megakaryocytes (D10), and proplatelet-forming megakaryocytes (D12). Then, we correlated the enzyme transcript levels to those of their respective tubulin PTMs by Western Blots in human CD34⁺-derived cultured megakaryocytes (D7 to D12), CD34⁺-derived cultured platelets (CP) and human blood-derived platelets (DP), and also in brain and testis extracts for reference. We used SDS-polyacrylamide gels specifically designed to separate both the α and β -tubulins, and probed the different PTMs with a panel of validated antibodies, as described in Table 2. Care was taken to load equivalent amount of total tubulin, which served as a yardstick for PTM comparison between samples. For quality control purposes, the percentage of CD41⁺CD42c⁺ megakaryocytes, GATA1 transcripts as well as the expression level of the α 4A- and β 1-tubulin proteins were followed throughout the culture to validate our protocol (**Figure S1**).

Tubulin acetylation

Tubulin acetylation is the most studied PTM in the platelet lineage, where ATAT1 was found to be the main but not the sole acetylase, and HDAC6 the main deacetylase^{26,27}. The first experimental evidence to link this PTM to platelet biogenesis came from studies with HDAC-inhibitors. In particular, the pan HDAC inhibitor Panobinostat and the HDAC6 inhibitor Tubastatin A were shown to decrease platelet counts in patients and to inhibit megakaryopoiesis in vitro, respectively^{28,29}. Tu-

tubulin hyperacetylation was commonly reported in these cases, which led to believe that HDAC6 regulated platelet production through its ability to deacetylate tubulin. However, the detrimental effects observed after HDAC6 inhibition were later found to be instead caused by the increased acetylation and inactivation of another HDAC6-target, cortactin²⁸. This observation therefore casted serious doubts on the functional importance of tubulin acetylation in platelet biogenesis, and mice genetically inactivated for HDAC6 or ATAT1 reinforced this idea in view of their normal platelet counts^{27,28}. Here, we observed that ATAT1 transcripts were maintained at low levels, while those of HDAC6 progressively increased to reach their highest levels in the fully mature megakaryocytes (**Figure 1A**). This observation raised the possibility for tubulin acetylation to progressively decrease as megakaryopoiesis proceeded. This hypothesis was however not confirmed by Western Blot analysis, which instead revealed stable tubulin acetylation in both the differentiating megakaryocytes and the platelets (**Figure 2Ai-ii**). Interestingly, megakaryocyte tubulin appeared to be weakly acetylated in comparison to that of the brain and testis extracts (**Figure 2Aiii**). This observation therefore indicates that tubulin acetylation is already initially very low in immature megakaryocytes, and suggest that this PTM is kept at a low level by the HDAC6 enzyme. To be noted, the tubulin acetylation levels of cultured platelets were found to be equivalent to those of the native donor-derived platelets (**Figure 2Aii**). This is remarkable since the latter correspond to a mix of new and progressively ageing platelets, in contrast to the newly produced cultured platelets. This suggests that the tubulin deacetylase activity of HDAC6 is tightly controlled during the entire platelet lifespan (≈ 10 days in the circulation). Together, the present results do not favor a major role for this PTM in platelet biogenesis in view of the low stable levels of tubulin acetylation of megakaryocytes and platelets, in agreement with the normal phenotypes observed in HDAC6- and ATAT1-inactivated mice.

2. Tubulin detyrosination

Platelets are known to contain mostly detyrosinated microtubules in their marginal band. One likely contributing factor is the sizeable proportion of $\alpha 4A$ -tubulin found in platelets, an isotype that is synthesized without the C-terminal tyrosine residue⁹. It is also possible that the enzymatic equilibrium of the detyrosination-tyrosination cycle shifts towards detyrosination as megakaryocytes ma-

ture, a possibility that has not yet been evaluated. Following the early discovery of the tubulin-tyrosine ligase TTL ³⁰, the recent identification of the vasohibins VASH1 and VASH2 as the enzymes responsible for detyrosination in association with the small vasohibin binding protein SVBP ^{31,32} opened the way to evaluate this possibility. Analysis of the full set of enzymes throughout megakaryocyte differentiation by qRT-PCR revealed a gradual increase in VASH1 transcripts accompanied by a slight decrease in TTL expression. In contrast, the levels of SVBP remained constant, while those of VASH2 drastically decreased (**Figure 1B**). This profile of expression suggests that low tyrosination in platelets could indeed be additionally due to an increased detyrosination activity, likely by the SVBP/VASH1 complex. Direct observation of the PTM by western blotting agreed with this proposal by showing a concurrent decrease in tyrosinated (**Figure 2Bi**) and increase in detyrosinated (**Figure 2Ci**) tubulin species between days 7 and 12 of differentiation. In addition, $\Delta 2$ -tubulin species progressively accumulated signing cleavage of the C-terminal exposed glutamate (**Figure 2Di**). It can therefore be concluded that a combined accumulation of the C-terminal tyrosine-lacking $\alpha 4A$ -tubulin and increased detyrosination by VASH1 gives rise to microtubules that are skewed toward detyrosinated and $\Delta 2$ forms in the mature megakaryocytes. This trend continued in platelets, in which tubulin tyrosination became almost undetectable (**Figure 2Bii**), the level of $\Delta 2$ -tubulin progressively increased (**Figure 2Dii**) while that of the detyrosinated form remained constant (**Figure 2Cii**). Together, these results thus evoke a continuous VASH1-dependent cleavage of Tyr-tubulin relayed by deglutamylation, resulting in the accumulation of the $\Delta 2$ -tubulin species in the final platelet product. Finally, comparison of mature megakaryocytes with brain and testis whole extracts showed equivalent levels of detyrosinated tubulin (**Figure 2Ciii**), higher levels of tyrosinated form (**Figure 2Biii**), but less $\Delta 2$ -tubulin (**Figure 2Dii**). The progressive shift towards detyrosinated tubulin in the most mature megakaryocyte might thus be functionally relevant for the final stage of platelet and marginal band formation. For instance, detyrosinated and $\Delta 2$ -tubulins might be involved in proplatelet elongation. This process has indeed been shown to rely on dyneins *in vitro* ³³, whose processivity is known to be influenced by tubulin tyrosination levels ³⁴. Altogether, our results strongly suggest that detyrosination may play a role in platelet biogenesis. The recent possibility to genetically inactivate or overexpress the two enzymatic systems will likely provide a conclusive answer to this proposal

3. Tubulin polyglutamylation

Tubulin polyglutamylation is much more complex than tubulin acetylation or detyrosination. This PTM is controlled by a large panel of enzymes that either add or remove polyglutamate chains, namely with the TLL and the CCP family of enzymes. In particular, the TLL1, TLL4, TLL5, TLL6, TLL7, TLL11 and TLL13 enzymes initiate or extend the polyglutamate chains, while the CCP1, CCP2, CCP3, CCP4, CCP5 and CCP6 enzymes catalyze the inverse reaction. The CCP1, CCP2, CCP3, CCP4 and CCP6 enzyme also remove the C-terminal glutamates exposed after α -tubulin detyrosination^{13,38,39}. In addition, each enzyme displays clear substrate and reaction preferences that can potentially be compensated by other members of their family, therefore adding another level of complexity¹³. Functional studies of tubulin polyglutamylation are thus highly difficult to implement, and the knowledge of this PTM in the platelet lineage remains consequently very limited with reports of i) an enhanced expression of the TLL4, TLL6 and CCP6 transcripts in sorted CD41⁺ mouse megakaryocytes when compared to other medullar lineages⁴⁰ and ii) an increased expression of the TLL1, TLL2, TLL4, CCP4 and CCP6 transcripts in iPSC-derived CD42⁺ human megakaryocytes primed with heparin to initiate proplatelet extension²⁰. This substantial lack of information prompted us to assess the landscape of tubulin polyglutamylation in this lineage. To achieve that, we first followed the TLL and CCP transcripts during megakaryopoiesis by qRT-PCR. Five different expression profiles were observed, with namely, absent (TLL6, CCP2, CCP3, CCP6), low and stable (TLL11, TLL13), high and stable (TLL1, TLL5, CCP5), bell-shape evolution (TLL4) and progressive increased expression (TLL7, CCP1) (Figure 1C). At variance with the previous reports, we did not observe the rise in the expression of the TLL1 and TLL4 transcripts reported in iPSC-derived megakaryocytes, nor did we detect CCP4 and CCP6 transcripts. These differences could originate from the different species used (mouse vs human), the type of progenitors (iPSC-derived vs CD34⁺ cells) but also the culture conditions that were used to obtain megakaryocytes and proplatelets. From the present analysis, some predictions could be made for the levels of tubulin polyglutamylation at the protein level. The stable expression observed for TLL1 and TLL5 could translate into sustained polyglutamylation of α -tubulins. In contrast, the inverse trend of the TLL4 and TLL7 transcripts makes it difficult to predict the course of polyglutamylation of β -tubulins. Finally, stable expression of CCP1 and CCP5 could translate in the active removal of polyglutamate chains on

either α - or β -tubulins. CCP1 could additionally generate the $\Delta 2$ form of deetyrosinated α -tubulins (**Figure 2D**).

To probe these hypotheses, we again turned to western blotting, but this proved to be challenging due to a limited panel of well-tailored antibodies. Previous work in iPSC-derived CD42⁺ megakaryocytes found a positive signal in immunofluorescence and western blot assays with an antibody that recognizes polyglutamate side chains of 2E and more²⁰. However, this study merely provides a general view of this PTM in the last stages of megakaryopoiesis. Here, we performed a western blot analysis that covers several stages of megakaryocyte maturation and provides additional information with regards to the nature of the polyglutamate chains of both α - or β -tubulins. For that, we used the well-established GT335 antibody, which recognizes the branching points of polyglutamate chains independently of their length⁴¹. In addition, we used the polyE antibody, another well-described antibody that recognizes only the polyglutamate side chains of 3E and more¹³. These antibodies can therefore be used to draw the general picture for the polyglutamylation state of tubulins, with their overall number and their length, respectively. For α -tubulins, the number of polyglutamate chains gradually diminished as megakaryocytes achieved their full maturation (GT335, **Figure 3Ai-ii**), while the length of the remaining ones conversely increased (polyE, **Figure 3Bi-ii**). For β -tubulin, the number and length of polyglutamate chains remained stable during megakaryocyte maturation (**Figure 3Ai-ii**), but they both drastically plummeted in platelet lysates where they became almost un-detectable (**Figure 3Bi-ii**). Altogether, the present data favors a scenario where tubulin polyglutamylation becomes gradually prominent in the form of longer chains in α -tubulin, while conversely disappearing on β -tubulins as megakaryocyte mature. It is to note however that tubulin polyglutamylation levels remain extremely low in the platelet lineage when compared to those found in the brain and testis lysates (**Figure 3Aiii and 3Biii**), where this PTM is known to play essential functions. These results thus cast doubts on the functional importance of this PTM in megakaryocytes and platelets. These levels and the apparent α -to- β -tubulin transition might nonetheless be crucial for microtubules to fulfill their roles in the final stages of platelet biogenesis, in proplatelet formation or in the establishment of the marginal band's unique organization. In fact, a role of tubulin polyglutamylation in these late stages has been already proposed from studies in CHO cells

expressing a mutant form of the $\alpha\text{IIb}\beta_3$ integrin where glutamylation was found to govern formation of a marginal band-like structure ¹⁹. Caution should be raised however in translating this data to native proplatelets in view of the very different nature of the proplatelet-like extensions in these cells versus native megakaryocytes. In reality, these extensions are more reminiscent to integrin signaling-dependent neurite out-growth ⁴², which also displays bulbous structures at their extremities, than to bona fide pro-platelet buds, and it remains to be clearly demonstrated that the microtubule bundles in this heterologous model fully circle proplatelet-like elements under the membrane as in the marginal band.

4. Tubulin glycylation

Tubulin polyglycylation, similar to polyglutamylation, is controlled by several enzymes that either add or remove glycine residues. The TTLL family of enzymes, which participate in polyglutamylation, is also responsible for the initiation and extension of the polyglycine chains. In particular, both the TTLL3 and TTLL8 initiate the chains, while the TTLL10 ensure their subsequent elongation ⁴². The enzymes that catalyze the inverse reaction still remain to be identified. For many years, tubulin polyglycylation has only been detected and studied in cilia and flagella ^{17,18}. However, Kahn et al recently asserted that mature megakaryocytes and proplatelets contained polyglycylated tubulins based on the presence of the TTLL3 and TTLL10 transcripts and positive signals with the AXO49 antibody in immunolabeling assays ²⁰. To assess if tubulin polyglycylation is indeed found during platelet biogenesis, we first analyzed the TTLL3, TTLL8 and TTLL10 transcripts by qRT-PCR. Here, after an initial drop, we observed that TTLL3 transcripts progressively increased to reach their original levels in the proplatelet-forming megakaryocytes (**Figure 1D**). By contrast, TTLL10 transcripts were barely detectable throughout megakaryocyte differentiation (**Figure 1D**), while those of TTLL8 were not detected at all. Together, these profiles suggested that tubulin polyglycylation, if present in the megakaryocytes and the platelets, would mainly be in the form of monoglycylated tubulin. To evaluate this hypothesis, we performed a western blot analysis with the recently developed GlyPep-1 antibody, which recognizes both mono- and bi-glycyated tubulin ¹⁷, as well as with the AXO49 antibody, which recognizes polyglycyated chains of >3G ¹⁷. For α -tubulins, the levels of mono/bi-glycylation progressively decreased as megakaryocytes reached their fully mature state (**Figure 4Ai**).

This trend continued in cultured platelets, at variance with donor-derived platelets which were positive for mono/bi-glycylated α -tubulin (**Figure 4Aii**). It is to note however that mono/bi-glycylated α -tubulin levels remain extremely low in the platelet lineage when compared to those found in the brain and testis (**Figure 4Aiii**). Polyglycylated α -tubulins were also detected in the megakaryocytes and platelets, and followed a dynamic comparable to that of mono/bi-glycylated α -tubulin (**Figure 4Bi-ii**). Interestingly, their levels were this time found at similar levels to those in mouse testis (**Figure 4Biii**). For β -tubulins, we observed weak signals for mono/bi-glycylated tubulin that decreased as megakaryocytes matured (**Figure 4Ai**) and completely disappeared in the cultured and donor-derived platelets (**Figure 4Aii**). Again, mono/bi-glycylated β -tubulins levels extremely low in the platelet lineage when compared to those found in the testis, and to a weaker extent, the brain (**Figure 4Aiii**). Finally, polyglycylated β -tubulin was not detected in neither the megakaryocytes, the platelets nor the reference tissues (**Figure 4Bi-ii-iii**). Together, these results indicate that megakaryocyte and platelet microtubules are only weakly mono/bi-glycylated when compared to testis extracts. However, megakaryocyte and platelet microtubules do appear to be polyglycylated on α -tubulins despite barely detectable TTLL10 transcripts and the reported inactivity of this enzyme in humans⁴². This result is therefore very intriguing, and raises the question as to whether i) this signal indeed corresponds to tubulin and; ii) which enzyme could be involved in elongating tubulin glycine chains in the platelet lineage. Further analysis will be required to answer these questions. The biological relevance of this PTM in platelet production is thus still an open question, and the development of enzyme deficient mice and the availability of patients that bear enzyme mutations is likely to provide an answer in the near future²⁰.

In conclusion, we have provided here the first comprehensive overview/survey of the repertoire and evolution of the tubulin PTM enzymes and modifications during megakaryocyte differentiation and in newly produced platelets which may serve as a landmark resource or reference for future functional exploration.

ACKNOWLEDGMENTS: This work was supported by the University of Strasbourg and by The Fondation pour la Recherche Médicale (grant FDT202106013085 to QK).

AUTHORSHIP: Contributions: Q.K. prepared the samples, performed protein studies, analyzed data, and co-wrote the paper; S.M. prepared the samples, performed protein studies and analyzed data; I.B. performed transcript studies; C.J. discussed results and analyzed the data; F.L. designed the study, analyzed the data, and wrote the paper.

CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURES: The authors declare no competing financial interests.

BIBLIOGRAPHY

1. Muroyama A, Lechler T. Microtubule organization, dynamics and functions in differentiated cells. *Development*. 2017;144(17):3012–3021.
2. Janke C, Magiera MM. The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020;21(6):307–326.
3. van der Meijden PEJ, Heemskerk JWM. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat. Rev. Cardiol.* 2019;16(3):166–179.
4. Cuenca-Zamora EJ, Ferrer-Marín F, Rivera J, Teruel-Montoya R. Tubulin in Platelets: When the Shape Matters. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(14):1–13.
5. Boscher J, Guinard I, Eckly A, Lanza F, Léon C. Blood platelet formation at a glance. *J. Cell Sci.* 2020;133(20):1–8.
6. Behnke O. Further studies on microtubules. A marginal bundle in human and rat thrombocytes. *J. Ultrastruct. Res.* 1965;13(5):469–77.
7. White JG, Rao GHR. Microtubule coils versus the surface membrane cytoskeleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape. *Am. J. Pathol.* 1998;152(2):597–609.
8. Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, et al. A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr. Biol.* 2001;11(8):579–86.
9. Strassel C, Magiera MM, Dupuis A, et al. An essential role for α 4A-tubulin in platelet biogenesis. *Life Sci. alliance*. 2019;2(1):e201900309.
10. Portran D, Schaedel L, Xu Z, Théry M, Nachury M V. Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. *Nat. Cell Biol.* 2017;19(4):391–398.
11. Xu Z, Schaedel L, Portran D, et al. Microtubules acquire resistance from mechanical breakage through intraluminal acetylation. *Science (80-.)*. 2017;356(6335):328–332.
12. Fernandez-Gonzalez A, La Spada AR, Treadaway J, et al. Purkinje cell degeneration (pcd) phenotypes caused by mutations in the axotomy-induced gene, *Nna1*. *Science*. 2002;295(5561):1904–6.
13. Rogowski K, van Dijk J, Magiera MM, et al. A family of protein-deglutamyating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell*. 2010;143(4):564–78.

14. Magiera MM, Bodakuntla S, Žiak J, et al. Excessive tubulin polyglutamylation causes neurodegeneration and perturbs neuronal transport. *EMBO J.* 2018;37(23):1-14.
15. Shashi V, Magiera MM, Klein D, et al. Loss of tubulin deglutamyrase CCP 1 causes infantile-onset neurodegeneration . *EMBO J.* 2018;37(23):1-12.
16. Bosch Grau M, Gonzalez Curto G, Rocha C, et al. Tubulin glycyllases and glutamylases have distinct functions in stabilization and motility of ependymal cilia. *J. Cell Biol.* 2013;202(3):441-451.
17. Gadadhar S, Dadi H, Bodakuntla S, et al. Tubulin glycylation controls primary cilia length. *J. Cell Biol.* 2017;216(9):2701-2713.
18. Gadadhar S, Alvarez Viar G, Hansen JN, et al. Tubulin glycylation controls axonemal dynein activity, flagellar beat, and male fertility. *Science.* 2021;371(6525):.
19. van Dijk J, Bompard G, Cau J, et al. Microtubule polyglutamylation and acetylation drive microtubule dynamics critical for platelet formation. *BMC Biol.* 2018;16(1):1-17.
20. Khan AO, Slater A, Maclachlan A, et al. Post-translational polymodification of β 1-tubulin regulates motor protein localisation in platelet production and function. *Haematologica.* 2022;107(1):243-259.
21. Strassel C, Brouard N, Mallo L, et al. Aryl hydrocarbon receptor-dependent enrichment of a megakaryocytic precursor with a high potential to produce proplatelets. *Blood.* 2016;127(18):2231-40.
22. Cazenave J-P, Ohlmann P, Cassel D, et al. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol. Biol.* 2004;272(5):13-28.
23. Do Sacramento V, Mallo L, Freund M, et al. Functional properties of human platelets derived in vitro from CD34+ cells. *Sci. Rep.* 2020;10(1):914.
24. Bodakuntla S, Schnitzler A, Villablanca C, et al. Tubulin polyglutamylation is a general traffic-control mechanism in hippocampal neurons. *J. Cell Sci.* 2020;133(3):.
25. Lacroix B, Janke C. Generation of differentially polyglutamylated microtubules. *Methods Mol. Biol.* 2011;777:57-69.
26. Sadoul K, Wang J, Diagouraga B, et al. HDAC6 controls the kinetics of platelet activation. *Blood.* 2012;120(20):4215-8.

27. Ribba AS, Batzenschlager M, Rabat C, et al. Marginal band microtubules are acetylated by α TAT1. *Platelets*. 2020;
28. Messaoudi K, Ali A, Ishaq R, et al. Critical role of the HDAC6-cortactin axis in human megakaryocyte maturation leading to a proplatelet-formation defect. *Nat. Commun.* 2017;8(1):.
29. Iancu-Rubin C, Gajzer D, Mosoyan G, et al. Panobinostat (LBH589)-induced acetylation of tubulin impairs megakaryocyte maturation and platelet formation. *Exp. Hematol.* 2012;40(7):564-574.
30. Raybin D, Flavin M. Enzyme which specifically adds tyrosine to the α chain of tubulin. *Biochemistry*. 1977;16(10):2189-2194.
31. Aillaud C, Bosc C, Peris L, et al. Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCPs) that regulate neuron differentiation. *Science*. 2017;358(6369):1448-1453.
32. Nieuwenhuis J, Adamopoulos A, Bleijerveld OB, et al. Vasohibins encode tubulin detyrosinating activity. *Science*. 2017;358(6369):1453-1456.
33. Bender M, Thon JN, Ehrlicher AJ, et al. Microtubule sliding drives proplatelet elongation and is dependent on cytoplasmic dynein. *Blood*. 2015;125(5):860-8.
34. McKenney RJ, Huynh W, Vale RD, Sirajuddin M. Tyrosination of α -tubulin controls the initiation of processive dynein-dynactin motility. *EMBO J.* 2016;35(11):1175-85.
35. Pagnamenta AT, Heemeryck P, Martin HC, et al. Defective tubulin detyrosination causes structural brain abnormalities with cognitive deficiency in humans and mice. *Hum. Mol. Genet.* 2019;28(20):3391-3405.
36. Robison P, Caporizzo MA, Ahmadzadeh H, et al. Detyrosinated microtubules buckle and bear load in contracting cardiomyocytes. *Science*. 2016;352(6284):aaf0659.
37. Sirajuddin M, Rice LM, Vale RD. Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. *Nat. Cell Biol.* 2014;16(4):335-44.
38. van Dijk J, Rogowski K, Miro J, et al. A targeted multienzyme mechanism for selective microtubule polyglutamylation. *Mol. Cell*. 2007;26(3):437-48.
39. Tort O, Tanco S, Rocha C, et al. The cytosolic carboxypeptidases CCP2 and CCP3 catalyze posttranslational removal of acidic amino acids. *Mol. Biol. Cell*. 2014;25(19):3017-27.

40. Ye B, Li C, Yang Z, et al. Cytosolic carboxypeptidase CCP6 is required for megakaryopoiesis by modulating Mad2 polyglutamylation. *J. Exp. Med.* 2014;211(12):2439-54.
41. Bré MH, de Néchaud B, Wolff A, Fleury A. Glutamylated tubulin probed in ciliates with the monoclonal antibody GT335. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 1994;27(4):337-349.
42. Schaffner-Reckinger E, Salsmann A, Debili N, et al. Overexpression of the partially activated alpha(IIb)beta3D723H integrin salt bridge mutant downregulates RhoA activity and induces microtubule-dependent proplatelet-like extensions in Chinese hamster ovary cells. *J. Thromb. Haemost.* 2009;7(7):1207-17.
43. Rogowski K, Juge F, van Dijk J, et al. Evolutionary Divergence of Enzymatic Mechanisms for Posttranslational Polyglycylation. *Cell.* 2009;137(6):1076-1087.

TABLES:

Table 1: List of primers used for qRT-PCR.

Target	Forward_primer	Reverse_primer
TTL	CATCAGCTGGTGCCAAAGGTGAG	CCTGGCTGTTCGATGAAATCCAGA
TTL1	ATTCCCGACTGCAAGTGGAACA	CTGGGCCAGCTCCTCGTCAT
TTL2	GGTCTGCAGAGTTTGGGTGATGT	TCITCAAAGGCTTGCTTTCCTGTA
TTL3	GGAGGGGGATCGGAACATCT	CATCTCATCCAGGCGGTTTCAT
TTL4	CCATGGAAACAAGCTCAAAGGAGTA	CAGTGGGGCTGAGTCAGAGACAA
TTL5	GCGCCTCTATGTGCTCGTACT	TGCGGATGTTCTTGGAGCCTT
TTL6	ACCCTAACCTAGACAACCTGGATGA	CTTGAACGAAGTTGGAAGTGTGCT
TTL7	GTACATCCCACCAAACGAGTCCA	TGCTGCCTTTGTCTTCAGTTTCAT
TTL8	GAATGGAATGACCTGACACAGCAGTA	ACTTTTCGAATCAGTGATGGAAGCA
TTL9	CCGCTTCAAGACCACCCTCAT	GCCAGCTGACATCACACCAATAGA
TTL10	CCCAGTACCCAAACCAAGGTCTT	AAGCCTGCCTCTCGTCTCTGATGT
TTL11	ACCAGCGGGACTCAGGGATGT	CATGGAGAGGTTGCAGCTTGAAGT
TTL12	CATCCCTCAGTTTGAGAAGCAGTA	GCCTTGAAGATCTCAGCCTGAA
TTL13	CCTGGGGTTTGACATCTTACTGGA	AAGCTTGGGGAGTGGTTTACCTCTA
AGTPBP1	TTCCACAGAGTCAGATACTGCCAGAT	CAGAAGTCCATGCCTGTAGAACCT
AGBL2	AATCTGCAGAAAGCCGTCAGAGT	AGTGTGTTTGTCCGTGTAGAGGTCA
AGBL3	CTGTTTACCCAAACTCCAAGGAAGAT	GGATGTTCCGGTTACCCCAACT
AGBL1	GAGCTGTCCTGTAGCTTTGAGGAACT	AAGCAACACTTGGAAATGTGGTGGT
AGBL5	GCACCCAAAAGGTCAGCCAT	GCCGCCTTCTGTCTGAGCA
AGBL4	CCAAGAGTCTTTACCGAGATGGGAT	CTGTGGTCTGGGCAGCGATAGT
ATAT1	AGCAACCGGCACGTTATTTACATA	GAGCCTCCCGGTCATCCAGTA
HDAC6	CTGGATCTGAACCCTGAGACAAGAGT	GGGCTTTCAGGGAAGCTGTCAT
SVBP	AGAACCAGCCTTCAGAGTGGAGA	GCTCCGTCATGACTCTGTTGAGA
VASH1	ACTCGGTGCTGGATGTGGAGA	CTGTCCCCTTGCCAATCTTGA
VASH2	CCCAGAGGGGGAGAGATGGTAG	GACCTGGGGAATTGAAGGCTTAG

Table 2: List of antibodies used in Western Blot.

Antibody	Clonality	Clone	Dilution	Availability
Primary antibodies				
Anti- α -tubulin (total)	Mouse monoclonal	DM1A	1 :5000	Sigma T6199
Anti- β -tubulin (total)	Mouse monoclonal	D66	1 :2500	Sigma T0198
Anti- α 4A-tubulin	Rabbit polyclonal	-	1 :1000	EFS Grand-Est Alsace , pAb7621 (Strassel et al., 2019)
Anti- β 1-tubulin	Rabbit polyclonal	-	1:1500	EFS Grand-Est Alsace, pAb5275
Anti- acetylated α -tubulin	Mouse monoclonal	6-11B-1	1:5000	Sigma T7451
Anti- tyrosinated α -tubulin	Mouse monoclonal	TUB-1A2	1:4000	Sigma T9028
Anti- detyrosinated α -tubulin	Rabbit polyclonal	-	1:3000	Merck Ab3201
Anti- Δ 2-tubulin	Rabbit polyclonal	-	1:4000	Merck Ab3203
Anti- polyglutamylated tubulin	Mouse monoclonal	GT335	1:1000	AdipoGen AG-20B-0020
Anti- polyglutamylated tubulin	Rabbit polyclonal	-	1:4000	PolyE, gift from Carsten Janke
Anti- polyglycylated tubulin	Mouse monoclonal	AXO49	1:5000	Merck MABS276
Anti- glycylated tubulin	Rabbit polyclonal	-	1:1000	Gly-pep1, gift from Carsten Janke
Secondary antibodies				
HRP-conjugated anti-mouse IgG	Goat polyclonal	-	1:20000	Jackson ImmunoResearch, 115-035-062
HRP-conjugated anti-rabbit IgG	Goat polyclonal	-	1:20000	Jackson ImmunoResearch, 111-035-144

FIGURE LEGENDS:

Figure 1. qRT-PCR analysis of the transcript of each known enzyme involved in (A) tubulin acetylation, (B) tubulin detyrosination, (C) tubulin polyglutamylolation and (D) tubulin polyglycylation during platelet biogenesis. For each modification, the transcript expression levels of their corresponding enzyme were studied in human cultured CD34⁺ hematopoietic progenitors (D0), in differentiating megakaryocyte progenitors (D4), in immature megakaryocytes (D7), in mature megakaryocytes (D10) and in proplatelet-forming megakaryocytes (D12). Please note that the transcripts of the TLL 2, 3, 6, 8, 9, 10 and 12 enzymes, as well as those of the CCP2, 3, 4 and 6 enzymes were not detected, and were therefore not represented. Results are expressed in fold change. Values were normalized using the *Tbp* (TATA Binding Protein) transcript as a reference using the $\Delta\Delta\text{ct}$ method. Bar graphs represent the mean \pm SEM. Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test.

Figure 2. Western Blot analysis of (A) tubulin acetylation, (B) tubulin tyrosination, (C) tubulin detyrosination and (D) tubulin $\Delta 2$ during platelet biogenesis. Each modification was compared between **(i)** human cultured immature megakaryocytes (D7), human cultured mature megakaryocytes (D10), and human cultured proplatelet-forming megakaryocytes (D12); **(ii)** human cultured proplatelet-forming megakaryocytes (D12), human cultured platelets (CP) and human blood-derived platelets (DP) and; **(iii)** human cultured proplatelet-forming megakaryocytes (D12), mouse brain lysates (Brain) and mouse testis lysates (Testis). The signal intensity of the modified α -tubulins was estimated by densitometry and normalized to that of total α -tubulin. Results are expressed as fold change. Bar graphs represent the mean \pm SEM. Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test.

Figure 3. Western Blot analysis of (A) tubulin polyglutamylolation chain length and (B) tubulin polyglutamate chain number during platelet biogenesis. The length and number of polyglutamate chains attached onto α - and β -tubulins were compared between **(i)** human cultured immature megakaryocytes (D7), human cultured mature megakaryocytes (D10), and human cultured proplatelet-forming megakaryocytes (D12); **(ii)** human cultured proplatelet-forming megakaryocytes (D12),

human cultured platelets (CP) and human blood-derived platelets (DP) and; **(iii)** human cultured proplatelet-forming megakaryocytes (D12), mouse brain lysates (Brain) and mouse testis lysates (Testis). In each case, the signal intensity of the modified α - and β -tubulins was estimated by densitometry and normalized to that of their corresponding total α -tubulin or β -tubulin. Results are expressed as fold change. Bar graphs represent the mean \pm SEM. Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test.

Figure 4. Western Blot analysis of (A) short ($\leq 2G$) and (B) long ($\geq 3G$) tubulin glycine chains during platelet biogenesis. The length of the polyglycine chains attached onto the α and β -tubulins were compared between **(i)** human cultured immature megakaryocytes (D7), human cultured mature megakaryocytes (D10), and human cultured proplatelet-forming megakaryocytes (D12); **(ii)** human cultured proplatelet-forming megakaryocytes (D12), human cultured platelets (CP) and human blood-derived platelets (DP) and; **(iii)** human cultured proplatelet-forming megakaryocytes (D12), mouse brain lysates (Brain) and mouse testis lysates (Testis). In each case, the signal intensity of the modified α - and β -tubulins was estimated by densitometry and normalized to that of their corresponding total α -tubulin or β -tubulin. Results are expressed as fold changes. Bar graphs represent the mean \pm SEM. Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test.

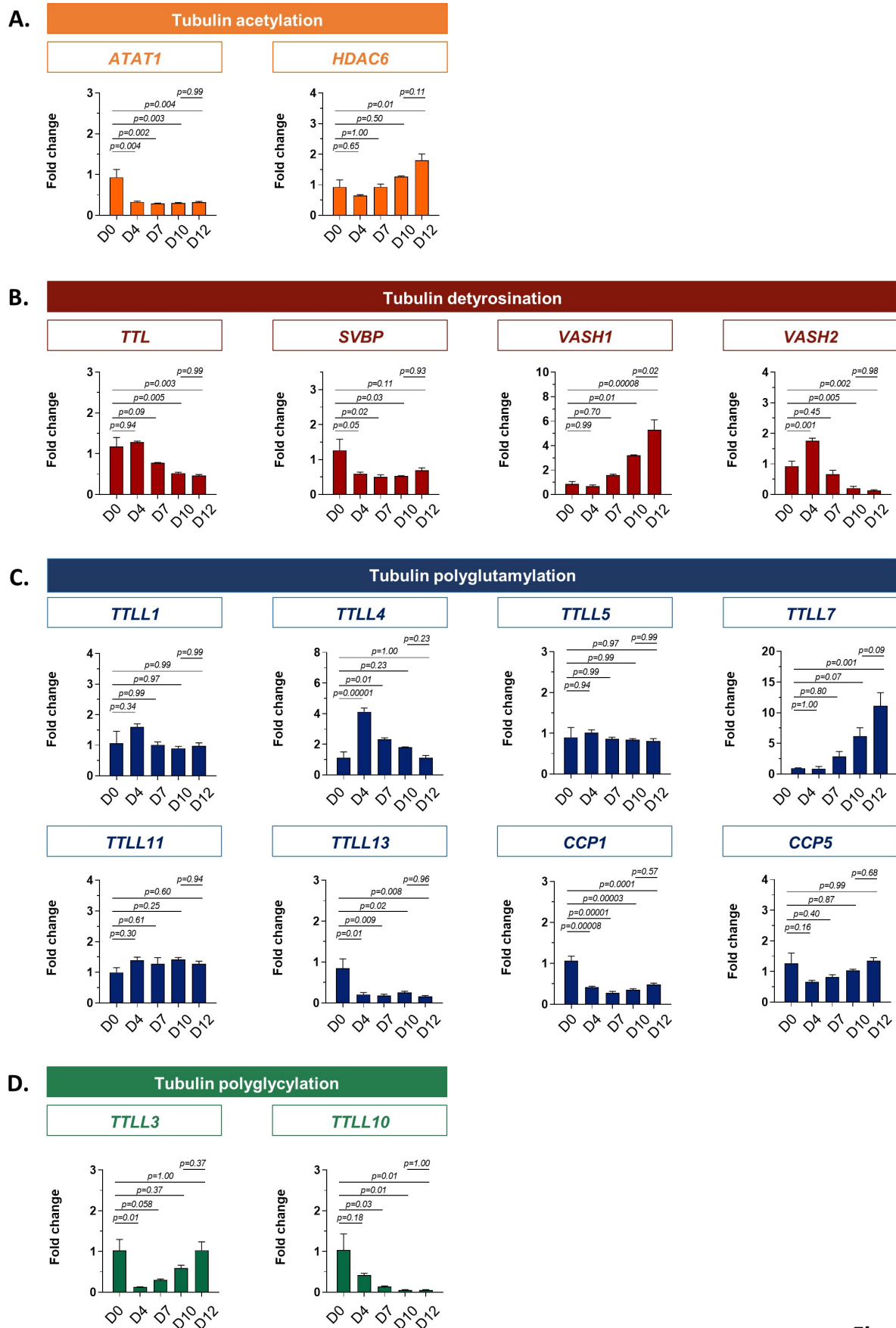


Figure 1

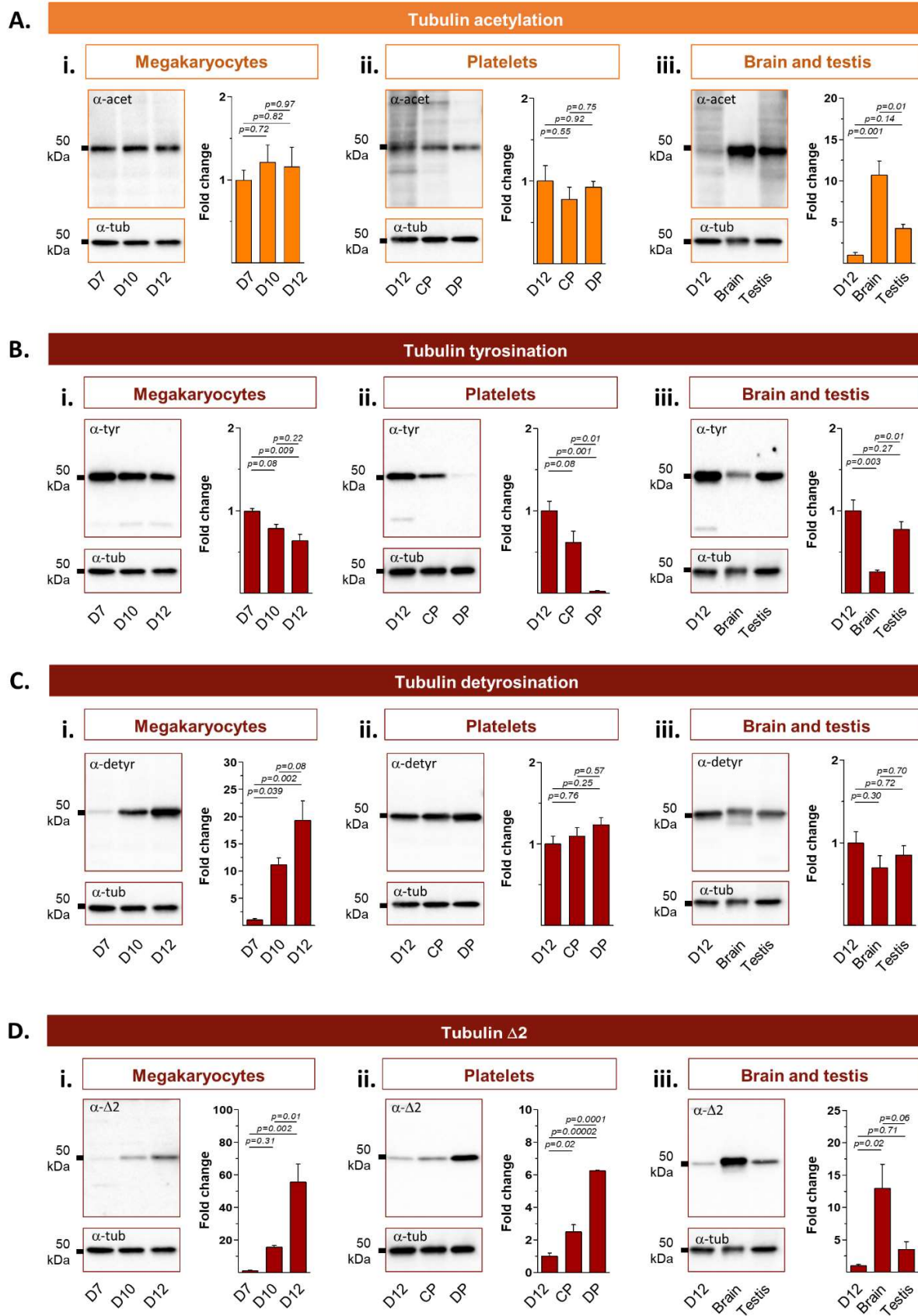
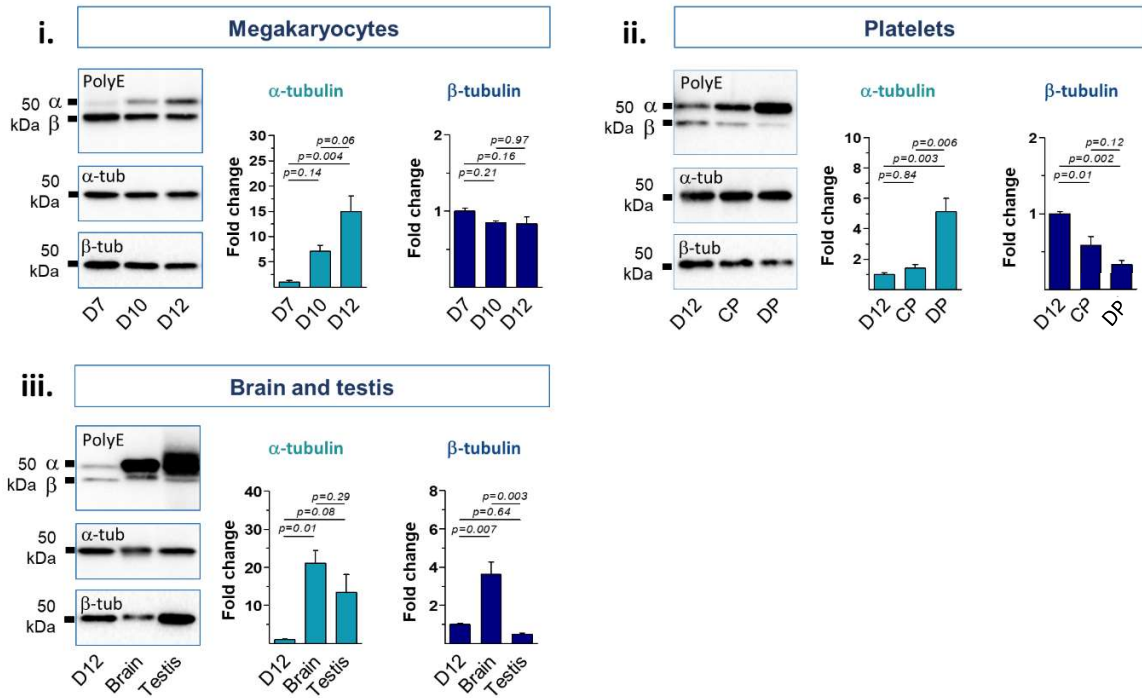


Figure 2

A. Tubulin polyglutamylation - PolyE



B. Tubulin polyglutamylation - GT335

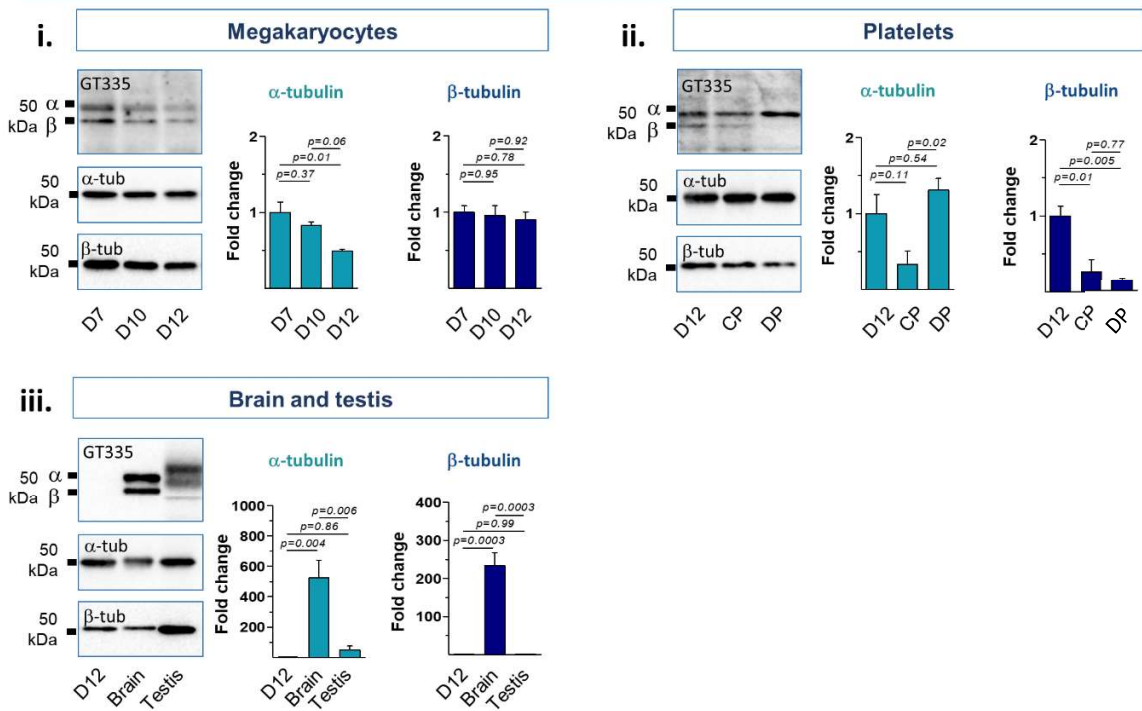
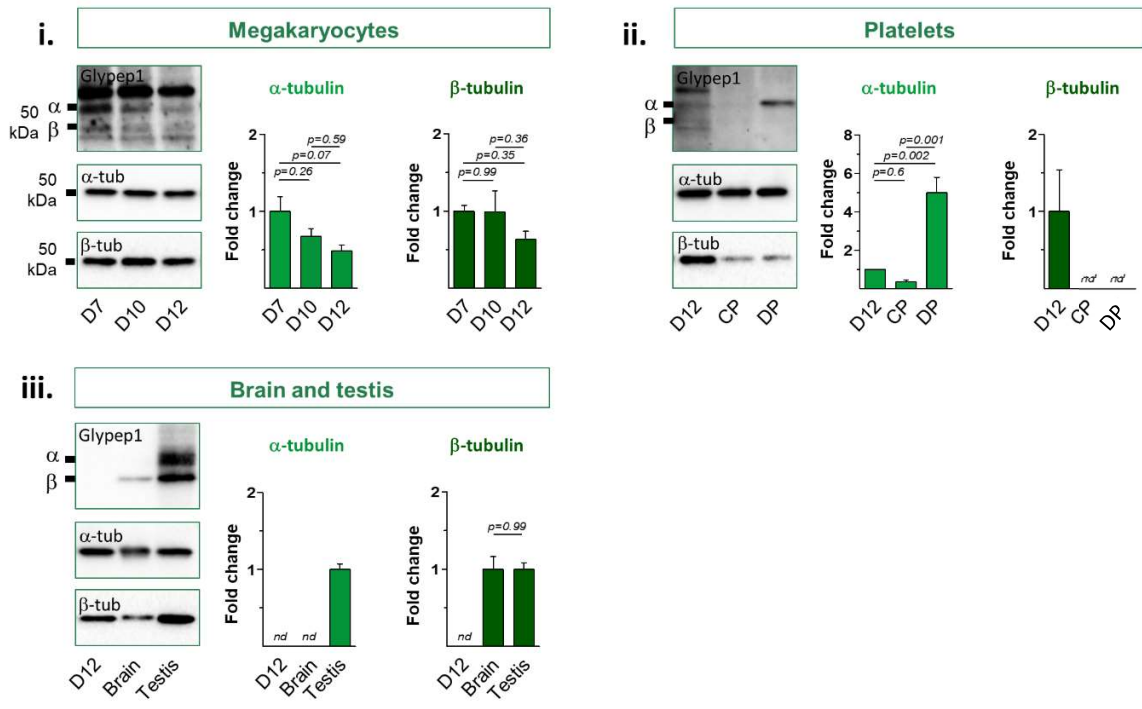


Figure 3

A. Tubulin polyglycylation (Glypep1)



B. Tubulin polyglycylation (AXO49)

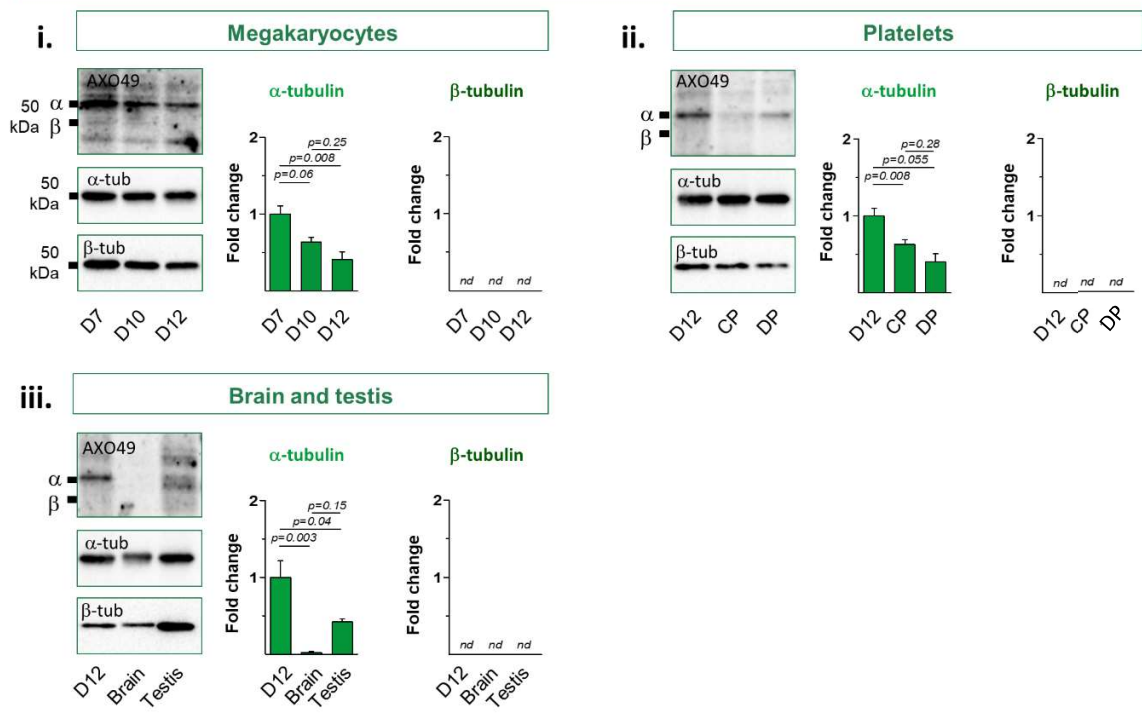


Figure 4

Supplementary Figure:

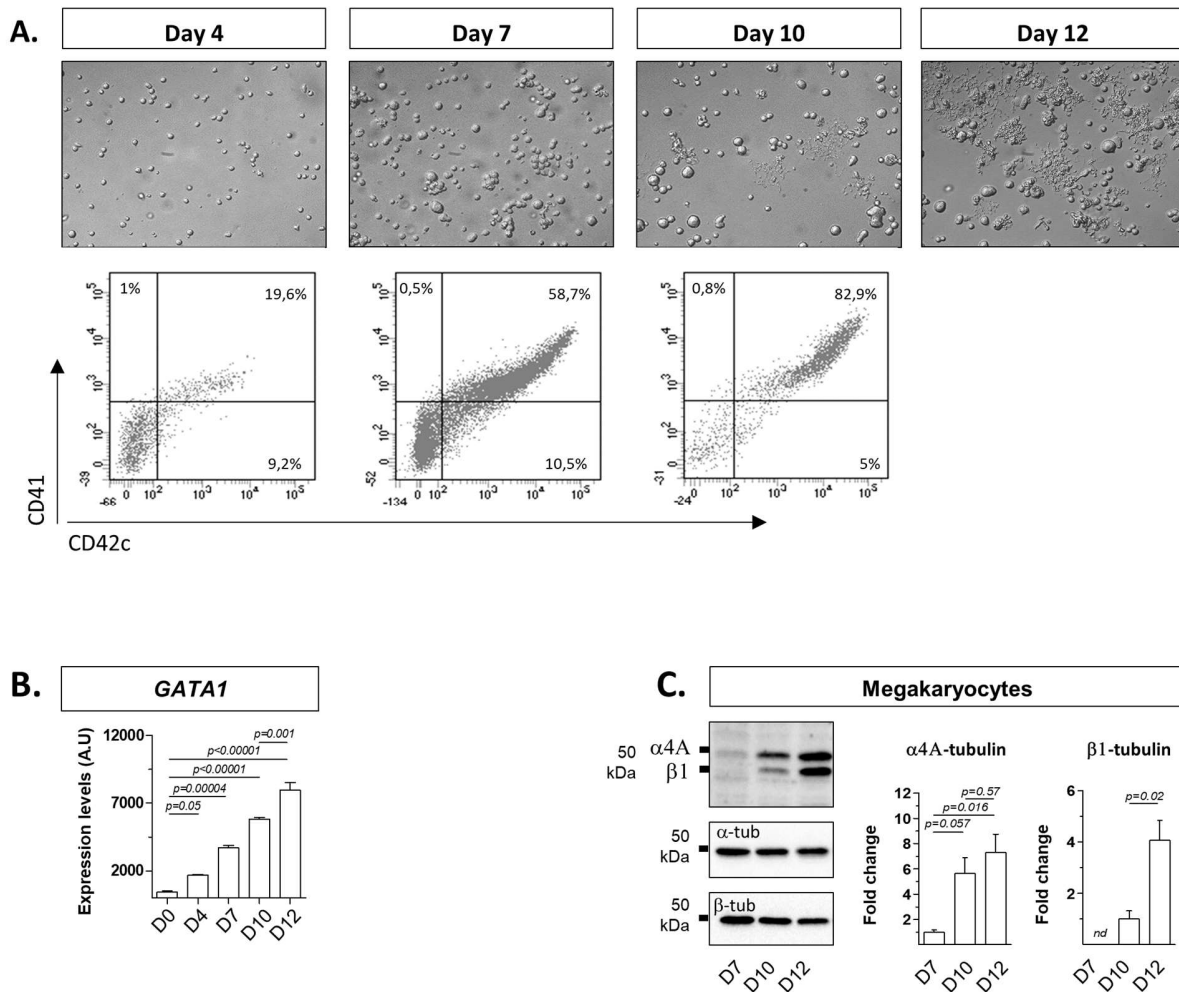


Figure S1. Validation of the culture protocol. (A) Representative DIC micrograph of differentiating megakaryocyte progenitors (Day 4), immature megakaryocytes (Day 7), mature megakaryocytes (Day 10) and proplatelet-forming megakaryocytes (Day 12). At Day 4, Day 7 and Day 10, cultured megakaryocytes were also analyzed for the presence of CD41 and CD42c (GPIIb/IIIa) by flow cytometry. **(B)** qRT-PCR analysis of the expression levels of the GATA1 transcript in human cultured CD34⁺ hematopoietic progenitors (D0), differentiating megakaryocyte progenitors (D4), immature megakaryocytes (D7), mature megakaryocytes (D10) and proplatelet-forming megakaryocytes (D12). Results are expressed in arbitrary units. Bar graphs represent the mean \pm SEM. Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test. **(C)** Western Blot analysis of α 4A- and β 1-tubulin expression in human cultured CD34⁺ hematopoietic progenitors

(D0), differentiating megakaryocyte progenitors (D4), immature megakaryocytes (D7), mature megakaryocytes (D10) and proplatelet-forming megakaryocytes (D12). The signal intensity of α - and β -tubulin was estimated by densitometry and normalized to that of their corresponding total α -tubulin or β -tubulin. Results are expressed as fold changes. Bar graphs represent the mean \pm SEM. Statistical analysis was conducted by one-way ANOVA followed by Tukey's HSD post-hoc test.

C. Conclusion :

Nous avons pu établir le répertoire des modifications post-traductionnelles de la tubuline au cours de la formation des plaquettes chez l'Homme. En ce qui concerne l'acétylation de la lysine K40 des tubulines α , son niveau reste stable tout au long du processus, bien qu'à des niveaux nettement plus faibles par rapport à ceux du cerveau ou des testicules. Étant donné que les souris inactivées pour l'acétylase ATAT1 ou la désacétylase HDAC6 ne présentent aucun défaut plaquettaire majeur (Ribba et al., 2021; Sadoul et al., 2012), nous concluons que l'acétylation de la tubuline ne semble pas jouer un rôle capital dans les mégacaryocytes et les plaquettes.

Pour ce qui est de la détyrosination, celle-ci montre une cinétique d'apparition croissante au cours de la différenciation des mégacaryocytes, qui coïncide avec les transcrits de la détyrosinase VASH1. Elle atteint son maximum dans les plaquettes, à des niveaux qui dépassent d'ailleurs ceux du cerveau où cette modification joue des rôles essentiels. Par conséquent, nous pensons que la détyrosination de la tubuline constitue l'une des modifications les plus prometteuses en terme de fonctionnalité dans la lignée mégacaryocytaire. Des résultats préliminaires sur des souris inactivées pour la protéine SVBP du complexe détyrosinase (qui est alors inactif) (Pagnamenta et al., 2019) semblent corroborer cette hypothèse. L'absence de détyrosinase prévient la détyrosination des tubulines lors de la maturation des mégacaryocytes. La lignée de souris inactivée pour SVBP montre par conséquent une hypertyrosination des microtubules dans les plaquettes et présente par ailleurs une hausse de la numération plaquettaire sanguine. Nous ne savons toutefois pas encore quelle étape du processus de biogenèse des plaquettes est affectée. L'ultrastructure ainsi que la bande marginale de leurs plaquettes étant normales (de même que leurs fonctions), le défaut pourrait prendre son origine au cours de la différenciation des mégacaryocytes. Des études sont en œuvre pour caractériser le phénotype de cette lignée afin de l'inclure dans le manuscrit.

Pour ce qui est des polymodifications, la glutamylation est très peu présente dans la lignée plaquettaire par rapport aux cerveau et testicules, où elle occupe des rôles fonctionnels importants. Il n'est toutefois pas exclu que cette modification puisse avoir un rôle important dans la biologie plaquettaire, bien que les lignées de souris inactivées pour les enzymes impliquées dans la glutamylation

que nous avons pu étudier n'aient aucun défaut. Étant donné la complexité du système enzymatique de la glutamylation, et à leur capacité à compenser la perte de l'une d'entre elles, il est probable qu'il faille avoir recours à des invalidations groupées de plusieurs enzymes afin d'observer un potentiel défaut. Enfin la glycylation, qui fut jusque-là rapportée pour n'être présente que dans les cellules ciliées comme les spermatozoïdes, fut curieusement détectée sous la forme de chaînes longues dans le système plaquettaire. Des études complémentaires nécessiteront toutefois d'être entreprises pour vérifier que le signal détecté soit effectivement spécifique de la tubuline et, le cas échéant, évaluer son importance fonctionnelle dans la biogenèse des plaquettes.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Premier axe : les isotypes de tubuline

Hypothèse de départ. Le répertoire d'expression des tubulines α et leurs potentielles implications dans les mégacaryocytes et les plaquettes n'étaient pas connus avant mon arrivée au laboratoire. Des données préliminaires du laboratoire indiquaient toutefois que l'isotype $\alpha 4A$ ainsi que l'isotype de tubuline $\alpha 8$, le plus divergent de la famille de tubuline α , puissent être impliqués dans la formation des plaquettes. **Dans cette partie, je me suis attaché à caractériser le rôle de ces deux isotypes de tubuline dans la lignée plaquettaire.**

Résultats principaux. Dans les travaux de cette thèse, nous avons d'abord pu confirmer l'hypothèse d'une implication fonctionnelle des deux isotypes de tubuline $\alpha 4A$ et $\alpha 8$ dans la formation des plaquettes. En effet, une lignée de souris porteuse d'une mutation ponctuelle homozygote de type faux-sens dans la tubuline $\alpha 4A$ (V260E) présente une macrothrombopénie et des défauts ultrastructuraux plaquettaires très proches de ceux causés par l'absence ou les mutations de la tubuline $\beta 1$. Les plaquettes mutées pour la tubuline $\alpha 4A$ ne sont ainsi plus discoïdes, mais plutôt ovoïdes, et leur bande marginale montre une réduction de moitié du nombre d'enroulements de microtubules. Des observations comparables furent réalisées chez l'Homme, où des mutations ponctuelles hétérozygotes faux-sens récapitulent le phénotype des souris V260E. De manière similaire, des mutations ponctuelles hétérozygotes faux-sens furent également identifiées dans la tubuline $\alpha 8$ chez l'Homme, et sont là-aussi responsables de macrothrombopénies congénitales associées à une perte de la forme discoïde due à une désorganisation de la bande marginale. Nous noterons que les mutations $\alpha 4A$ et $\alpha 8$, tout comme celles dans la tubuline $\beta 1$, ne s'accompagnent d'aucun défaut important de fonction plaquettaire. Il semble par conséquent que les isotypes $\alpha 4A$ et $\alpha 8$ occupent des rôles très proches de ceux de la tubuline $\beta 1$. En particulier, la forte similarité phénotypique des lignées V260E et KOB1 suggérerait une potentielle collaboration fonctionnelle des deux isotypes dans la formation des plaquettes chez la souris. Pour évaluer cette hypothèse, nous avons par conséquent généré une lignée de souris doublement inactivée pour les isotypes $\alpha 4A$ et $\beta 1$. Les souris présentent une forte macrothrombopénie ainsi qu'un degré de sphérocytose encore jamais décrit chez la souris dû à une absence complète de bande marginale, un phénotype qui confirme notre hypothèse de départ. La

double inactivation provoque également une forte tendance hémorragique d'une amplitude jamais rapportée pour un défaut lié à la tubuline, qui prendrait son origine dans la forme sphérique extrême des plaquettes DKO.

Microtubules, mégacaryopoïèse et thrombopoïèse. La macrothrombopénie est l'un des phénotypes partagés par la plupart des modèles mutés ou invalidés pour un isotype de tubuline plaquettaire (à l'exception des KOA4A sur lesquels nous reviendrons plus tard). Elle témoigne d'un défaut de biogenèse plaquettaire, plutôt que d'une consommation anormale de plaquettes car leur demi-vie dans la circulation est normale. L'origine exacte du défaut reste toutefois inconnue et semble essentiellement concentrée à deux niveaux, à savoir i) dans les étapes terminales de la mégacaryopoïèse, notamment lors du développement du DMS ; ii) dans le processus de thrombopoïèse. Le développement anormal du DMS évoque un rôle, encore inconnu aujourd'hui, des microtubules dans la formation de ce réseau. Plusieurs études rapportent l'implication de ces polymères dans le transport des vésicules depuis l'appareil de Golgi vers la membrane (Fourriere et al., 2020; Schmoranzner and Simon, 2003). La contribution du Golgi dans la formation du DMS ayant été précédemment mise en évidence par des travaux du laboratoire (Eckly et al., 2014), il est par conséquent possible que les microtubules puissent faciliter le transport des vésicules lipidiques jusqu'au pré-DMS des mégacaryocytes au cours de leur maturation. En plus d'un DMS anormal, les mégacaryocytes des modèles de tubuline montrent également une nette réduction, voire une incapacité totale dans le cas des KOB1 et DKO, à émettre des proplaquettes en culture. De tels défauts pouvaient être attendus au regard de la place centrale des microtubules dans l'élongation dynéine-dépendante de ces protrusions *in vitro*. Nous noterons par ailleurs que l'absence de tubuline $\beta 1$ est davantage préjudiciable qu'une absence de tubuline $\alpha 4A$. Bien que ceci n'ait pas été démontré, il est par conséquent possible que la liaison ou encore la processivité de la dynéine sur les microtubules des mégacaryocytes de culture soient spécifiquement régulées par cet isotype $\beta 1$. Dans l'ensemble, les résultats obtenus *in vitro* nécessiteront toutefois d'être considérés au regard du rôle distinct des microtubules dans le processus d'élongation des proplaquettes en condition native. Pour rappel, en culture, les microtubules sont nécessaires et suffisants pour assurer l'extension des proplaquettes via un mécanisme de coulisse reposant sur la dynéine. Ils ne sont à l'inverse pas requis pour cette fonction *in vivo* (Bornert et al., 2021). Des

observations par microscopie intravitale réalisées dans la moelle KOB1 corroborent cette différence fonctionnelle, puisque leurs mégacaryocytes sont en réalité toujours capables d'émettre des proplaquettes dans la circulation sanguine. Bien que nous ne l'ayons pas analysé, il est possible que le processus soit davantage impacté dans la lignée DKO compte-tenu du DMS très anormal de leurs mégacaryocytes et de leur plus grande thrombopénie. Enfin, il serait raisonnable de penser que les mutations ou invalidations géniques de tubuline puissent également perturber le mécanisme microtubule-dépendant de remodelage des proplaquettes dans la circulation proposé par Thon et al (Thon et al., 2012). Bien qu'il n'est pas encore validé *in vivo*, il est probable que les défauts tubulines puissent de cette manière conduire à l'apparition de la macrothrombopénie.

Bande marginale et courbures. Pour la première fois et par opposition aux plaquettes mutées ou inactivées pour seulement un isotype, les plaquettes doublement inactivées pour les tubulines $\alpha 4A$ et $\beta 1$ sont complètement dépourvues de bande marginale. Les raisons de cette absence restent pour l'heure encore inconnues. Le déficit quantitatif de tubuline totale mis en évidence par ELISA (réduction de 62%) pourrait constituer une première piste d'explication. Il ramènerait la concentration de tubuline plaquettaire à des valeurs suboptimales qui ne permettraient plus d'assurer la bonne polymérisation des microtubules dans les DKO. Nous resterons toutefois prudents car i) les plaquettes KOB1, qui montrent une diminution du même ordre de grandeur (réduction de 53%), réussissent toutes à assembler une bande marginale (bien que minimale) et ; ii) la concentration théorique en tubuline des plaquettes DKO serait, en tenant compte de cette diminution et de la hausse de leurs volumes plaquettaires, aux alentours des 45 μM (150 μM pour les contrôles), ce qui reste bien au-dessus de la concentration critique de polymérisation spontanée des tubulines *in vitro* (20 μM). La première hypothèse semble par conséquent insuffisante pour expliquer l'absence de bande marginale chez les DKO. La deuxième piste d'explication serait alors que les microtubules dépourvus de tubulines $\alpha 4A$ et $\beta 1$ ne puissent plus établir de courbures ou tolérer les contraintes mécaniques imposées par une telle architecture, un argument en faveur d'un code tubuline spécifique à la lignée mégacaryocytaire. Les isotypes de tubuline peuvent en effet modifier la dynamique ainsi que le comportement des microtubules qu'ils assemblent. Peu de données ont néanmoins été rapportées quant aux isotypes exprimés dans les plaquettes. La transfection de tubuline $\beta 1$ dans la lignée CHO, qui en

est normalement dépourvue, provoque toutefois une modification importante de leur cytosquelette de microtubule (Yang et al., 2011). En particulier, il devient très stable, tend à présenter des courbures et se relocalise spontanément dans l'espace sous-cortical : un comportement qui n'est pas sans rappeler celui observé dans le mégacaryocyte de culture. L'isotype β_1 semble ainsi détenir des propriétés uniques, de nature encore inconnue, qui lui permettraient d'organiser puis de courber les microtubules. De façon similaire, la surexpression de tubuline α_8 , mais pas de tubuline α_{1A} , augmente la vitesse de polymérisation et les courbures des microtubules dans la lignée Neuro-2a (Belvindrah et al., 2017). Les analyses structurales par ordinateur ont révélé que la tubuline α_8 , à l'inverse d' α_{1A} , était négativement chargée au niveau de la boucle H1-S2, ce qui diminuerait l'affinité inter-protofilaments dans les microtubules et favoriserait leurs courbures. **Il semble ainsi que les isotypes de tubuline exprimés dans les plaquettes (α_8 , et possiblement β_1 voire α_{4A}) portent des caractéristiques particulières compatibles avec l'assemblage de microtubules courbés et, par conséquent, de la bande marginale.**

Pour évaluer cette hypothèse, nous avons notamment envisagé de purifier la tubuline plaquettaire des lignées KOA4A, KOB1 et DKO puis de les faire polymériser *in vitro* dans un environnement géométriquement contraint afin d'évaluer leurs propriétés dynamiques ou mécaniques comme la rigidité. Des études similaires ont d'ailleurs déjà été utilisées pour mettre en lumière l'effet bénéfique de l'acétylation dans la résistance mécanique des microtubules (Portran et al., 2017; Xu et al., 2017). La purification de tubulines reste toutefois limitée techniquement dans le cas des plaquettes sanguines. En particulier, elle nécessite une large quantité de matériel de départ, dans des proportions déraisonnablement élevées (50-100 mL de sang, sachant qu'une souris donne <1 mL) qui nous ont freiné dans la mise au point de la technique. Une alternative serait de partir de plaquettes humaines, qu'il nous serait possible d'obtenir en grandes quantités par l'intermédiaire de dons de sang (jusqu'à 450 mL) anonymes et consentis effectués par l'Etablissement Français du Sang. Nous pourrions par la suite imaginer une étape d'immunopurification, permettant d'éliminer spécifiquement certains isotypes de notre suspension de tubuline purifiée, soit i) directement à l'aide d'anticorps spécifiques d'isotypes comme ceux dont nous disposons pour la tubuline β_1 et α_{4A} , ou soit ; ii) indirectement à l'aide d'anticorps qui reconnaissent plusieurs isotypes à l'exception d'un ou deux d'entre eux. Par

collaboration avec Carsten Janke, nous aurions notamment accès à un anticorps reconnaissant tous les isotypes de tubuline β à l'exception de la tubuline β_1 . L'ensemble de ces techniques nécessiteront toutefois un important de travail de mise au point.

Modèle de choix pour étudier le rôle de la bande marginale dans l'hémostase. Parmi tous les constituants cellulaires du fluide sanguin, les plaquettes présentent une forme lenticulaire atypique soutenue par une bande marginale de microtubules dont la formation et l'importance restent mal connues. Les modèles d'études dont nous disposions jusque-là étaient basés sur l'inactivation ou la mutation de l'un des trois isotypes α_4A , α_8 ou β_1 , qui entraînent une baisse de la production de plaquettes et perturbent l'assemblage de leur bande marginale. Les plaquettes ne présentent toutefois aucun défaut fonctionnel majeur et assurent toujours l'hémostase. Les données conduisirent alors la communauté à conclure que la bande marginale et la forme discoïde qu'elle soutient, ainsi que les microtubules au sens large du terme, n'étaient que peu voire pas impliqués dans les fonctions hémostatiques des plaquettes sanguines. **Toutes ces études présentent cependant une limite commune : bien qu'anormales, la bande marginale et les microtubules sont toujours présents, imposant ainsi un certain degré de discoïdité aux plaquettes, empêchant par conséquent de conclure définitivement sur leurs rôles dans l'hémostase.** La lignée de souris doublement inactivée pour les isotypes α_4A et β_1 permet spécifiquement d'aborder cette question, puisque leurs plaquettes sont sphériques et complètement dépourvues de bande marginale sans présenter de défaut majeur des fonctions plaquettaires. La lignée DKO constitue ainsi un outil puissant dans ce travail de thèse qui, outre que confirmer une collaboration fonctionnelle des isotypes α_4A et β_1 dans la formation des plaquettes, a permis de raviver la question de l'importance de la bande marginale et des microtubules, ainsi que de la forme discoïde des plaquettes, dans l'hémostase.

Absence de bande marginale, sphérocytose extrême et tendance hémorragique. Mis à part une sphéricité extrême, les plaquettes DKO ne présentent aucun défaut majeur d'activation en conditions statiques. Les agrégations par turbidimétrie, l'exposition de P-selectine (contenue à l'intérieur des granules α) ou encore l'activation des intégrines sont toutes normales en réponse à tous les agonistes testés. Bien que les souris DKO soient thrombopéniques (diminution de 60% par rapport aux souris

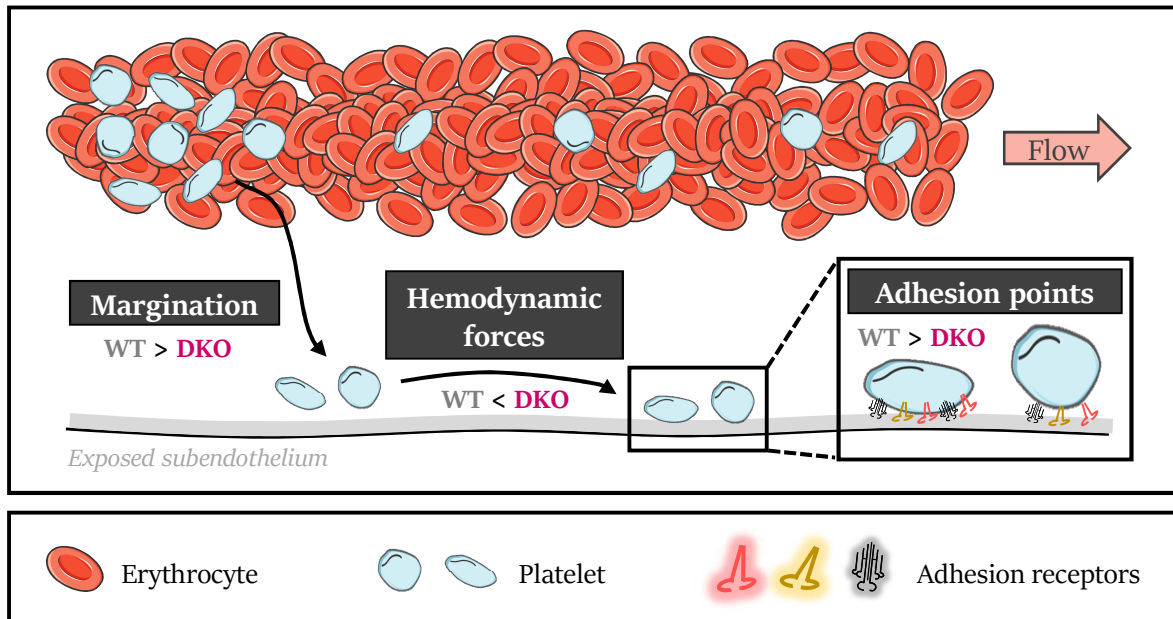


Figure 42 : Impacts potentiels de la géométrie des plaquettes sur leurs capacités hémostatiques. La forme sphérique des plaquettes DKO pourrait avoir un effet négatif sur leur capacité à assurer l'hémostase. Bien que nous n'ayons pas pu les explorer, trois hypothèses peuvent être avancées. Premièrement, le phénomène de margination des plaquettes (par les érythrocytes) vers la paroi vasculaire pourrait être moins efficace dans le cas des plaquettes de forme sphérique (DKO) par rapport à des plaquettes discoïdes (WT). Les plaquettes sphériques seraient par conséquent plus rares à la périphérie vasculaire, et donc moins disposées à participer à la formation d'un thrombus lors d'une brèche endothéliale. Deuxièmement, les forces hémodynamiques exercées sur des plaquettes de forme sphérique (DKO) seraient plus élevées que sur des plaquettes de forme discoïde (WT), notamment les forces de trainée et de portance. Les plaquettes sphériques (DKO) se déplaceraient ainsi plus rapidement dans le fluide et seraient également plus enclines à se détacher et à s'éloigner des parois vasculaires, les empêchant par conséquent d'adhérer au sous-endothélium et aux premières couches de plaquettes adhérentes. Troisièmement, pour les plaquettes sphériques (DKO) qui arrivent à adhérer, leur surface arrondie serait moins propice à l'établissement de points d'ancrage par rapport à des plaquettes discoïdes (WT). En particulier, les contours aplatis des plaquettes de forme discoïde (WT) offriraient un meilleur potentiel d'interaction que ceux de plaquettes de forme sphérique (DKO), en permettant notamment à davantage de récepteurs d'adhérence d'engager leurs ligands respectifs.

contrôles), leur numération (436 000 plaquettes/ μL) ne peut à elle-seule rendre compte d'une diathèse hémorragique aussi sévère. Il a été en effet montré que le chiffre plaquettaire dans la souris devait être en deçà du seuil des 100 000 plaquettes/ μL pour observer un effet net sur le temps de saignement à la queue (Morowski et al., 2013). La tendance hémorragique des DKO persiste même après une injection ponctuelle de Romiplostim, un analogue synthétique de la thrombopoïétine qui remonte leur numération à des valeurs normales ($>800\ 000$ plaquette/ μL), ce qui permet raisonnablement d'exclure l'implication de la numération. De façon marquante, la forte tendance hémorragique des souris DKO se traduit également sur i) un modèle de thromboembolisme, dans lequel toutes les souris meurent à l'exception des DKO et ; ii) un modèle de thrombose artérielle induite au chlorure de fer. Dans celui-ci, bien qu'une fine couche de plaquettes se dépose et recouvre la paroi vasculaire endommagée, aucune croissance du thrombus n'est observée, à l'inverse des KOA4A, KOB1 et contrôles WT. Là encore, nous n'attendons pas d'influence majeure de la numération des souris DKO (436 000 plaquettes/ μL) sur ce résultat. Il fut en effet rapporté que la numération plaquettaire doit être là également au moins inférieure à 100 000 plaquettes/ μL avant d'observer une réponse similaire dans ce modèle de thrombose (Morowski et al., 2013).

Des analyses complémentaires réalisées par microscopie électronique à balayage montrent que les plaquettes DKO composant cette fine couche péri-vasculaire gardent leur morphologie sphérique et restent très lâchement associées, à l'inverse des WT. Étant donné que les thrombi DKO ne grandissent pas dans le temps, ni ne se désagrègent, nous proposons que la forme sphérique extrême des plaquettes DKO les empêche d'interagir correctement avec l'endothélium et les premières couches de plaquettes pour former un thrombus. Bien que nous ne l'ayons pas démontré, trois mécanismes peuvent être avancés (**Figure 42**). Le premier impliquerait le phénomène de margination des plaquettes par les érythrocytes, dont l'efficacité serait réduite dans le cas de plaquettes sphériques (Chang et al., 2018; Vahidkhah and Bagchi, 2015). Le deuxième se rapporterait aux forces hémodynamiques subies par les plaquettes, notamment les forces de traînée et de portance. Elles seraient bien plus grandes dans le cas des plaquettes sphériques, ce qui les empêcherait d'établir des points d'ancrage stables avec l'endothélium (Mody et al., 2005). Nos expériences d'adhérence en flux sur facteur Willebrand corroborent cette hypothèse, avec des vitesses de translocation et une tendance

au détachement très élevées pour les DKO par comparaison aux autres génotypes. Le troisième impliquerait enfin la surface plaquettaire. Bien que celle-ci soit supérieure chez les DKO par rapport aux plaquettes discoïdes, les contours aplatis de ces dernières offrent une surface plane bien plus propice à l'établissement de points de contacts avec l'endothélium lésé et la première couche de plaquettes adhérente. Nos observations par microscopie électronique à balayage des carotides après induction de la thrombose au chlorure de fer supportent cette troisième hypothèse, avec des plaquettes DKO bien plus lâchement imbriquées entre elles par comparaison aux plaquettes WT. L'ensemble de ces défauts conduirait à des thrombi peu compacts, au sein desquels les agonistes solubles relargués suite à la dégranulation seraient plus facilement lavés par le flux sanguin, limitant encore davantage le recrutement et l'activation plaquettaire et la formation de thrombi. **Pour résumer, nos données présentent ainsi un faisceau convaincant d'arguments en faveur d'un rôle essentiel de la géométrie plaquettaire dans leurs fonctions hémostatiques. La forme discoïde se profile comme étant bien plus qu'un simple accessoire, mais comme étant parfaitement adaptée pour la bonne adhérence des plaquettes suite à une brèche endothéliale et la formation de thrombus.**

Il nous faut toutefois rester prudents dans l'interprétation, car nous n'avons pas démontré *stricto sensu* de lien direct de causalité entre la forme des plaquettes et leurs capacités hémostatiques, un lien qui reste difficilement démontrable par approche expérimentale (des études *in silico* auraient pu être envisagées). Par ailleurs, la double inactivation étant totale, nous ne pouvons pas complètement éliminer la possibilité de défauts additionnels, d'origine vasculaire notamment. Une telle éventualité reste toutefois peu probable au regard i) du profil d'expression très restreint de l'isotype β_1 (plaquettaire, et non vasculaire) et ; ii) de l'absence d'une tendance hémorragique chez les souris inactivées pour seulement l'isotype α_4A . Pour tenter d'exclure cette possibilité, des greffes croisées de moelle osseuse ont été entreprises entre des souris WT et DKO. De cette manière, les souris WT ayant reçu la moelle DKO présentent une macrothrombopénie comparable aux DKO non greffées, alors que les souris DKO ayant reçu la moelle WT montrent de leurs côtés des paramètres plaquettaires normaux. Nous avons ensuite évalué leur réponse hémostatique et thrombotique par le modèle de saignement à la queue et le modèle de thrombose induite au chlorure de fer, respectivement.

Les résultats du modèle d'hémostase furent toutefois difficilement exploitables. Pour une raison aujourd'hui encore inexpliquée, tous les groupes (y compris les contrôles WT ayant reçu de la moelle WT) présentaient en effet une tendance hémorragique. Par contre, les résultats du modèle de thrombose suggèrent que le défaut DKO est effectivement d'origine plaquettaire. En effet, les souris WT ayant reçu de la moelle DKO montrent une très nette réduction de la réponse thrombotique par comparaison aux contrôles WT ayant reçu de la moelle WT.

Invalidation ou mutation. De manière inattendue, les lignées de souris mutées (V260E) et déficientes pour l'isotype de tubuline $\alpha 4A$ ne présentent pas le même phénotype plaquettaire. La première montre une macrothrombopénie caractérisée par la présence de plaquettes ovoïdes ayant une bande marginale anormale, alors que la deuxième ne montre pas ce défaut. Dans les deux cas pourtant, la protéine de tubuline $\alpha 4A$ est absente de la lignée plaquettaire. Pour l'heure, nous n'avons pas d'explication qui rende compte de cette différence phénotypique. Une hypothèse envisageable serait que la tubuline $\alpha 4A$ mutée V260E, par opposition à la tubuline $\alpha 4A$ invalidée, soit produite mais immédiatement dégradée, perturbant au passage l'assemblage des hétérodimères de tubuline et la dynamique des microtubules. Nous n'avons toutefois pas davantage exploré cette hypothèse car les connaissances sur la biosynthèse des hétérodimères et l'impact d'éventuelles mutation de tubuline sur ce système sont très limitées. La tubuline $\alpha 4A$ représentant une proportion non négligeable de la tubuline plaquettaire, estimée à 30 et 70% de la tubuline α totale chez l'Homme et la souris, respectivement (Thomas, 2019), ceci pourrait constituer l'une des raisons pour laquelle la lignée plaquettaire est particulièrement affectée par la mutation. Nous remarquerons toutefois, dans le cas d'une inactivation génique chez la souris, que la quantité de tubuline α totale ne diminue pas de 70%. Elle chute plutôt d'environ 30%, évoquant ainsi l'existence d'un potentiel mécanisme de compensation par d'autres isotypes qui pourrait expliquer pourquoi les souris KO $\alpha 4A$ ont un phénotype plaquettaire normal.

La différence de phénotype entre mutation et invalidation génique semble également valable dans le cas de l'isotype $\alpha 8$. En effet, alors que les mutations chez l'Homme perturbent la biogenèse plaquettaire, l'inactivation de cet isotype chez la souris n'entraîne aucun phénotype. Nous avons généré

cette lignée au laboratoire, qui montrait des paramètres plaquettaires sanguins, une mégacaryopoïèse *in vitro* et une ultrastructure plaquettaire normale, sans signes éventuels d'une tendance hémorragique. Les raisons sous-jacentes à cette différence pourraient cependant différer du cas $\alpha 4A$. Bien que nous ne l'ayons pas démontré, elle pourrait s'expliquer par le fait i) que chez la souris, la tubuline $\alpha 8$ représente cette fois-ci une plus faible proportion de la tubuline α plaquettaire par rapport à l'Homme (6% contre 22%, respectivement) et ; ii) que les mutations de la tubuline $\alpha 8$ n'entraînent ici pas la dégradation de la protéine, mais empêchent plutôt son incorporation dans les microtubules. Ensemble, ils suggèrent que la tubuline $\alpha 8$ n'occupe pas la même importance chez l'Homme et la souris, chez qui sa fonction pourrait être potentiellement assurée par un autre isotype.

En conclusion, les travaux menés dans cette première partie de thèse ont d'abord une portée cognitive, contribuant à compléter notre connaissance du rôle des isotypes de tubuline dans la biologie plaquettaire. Les connaissances accumulées au cours de ce travail m'ont permis de rédiger un article de revue sur le code tubuline dans la biogenèse plaquettaire, où je suis 1^{er} auteur (Annexe 2). De manière plus appliquée, nos travaux relancent par ailleurs la question de l'importance de la forme discoïde et de la bande marginale des plaquettes dans leurs capacités hémostatiques, qui apparaît aujourd'hui comme étant plus qu'un simple accessoire. Nos résultats ont enfin une portée clinique, permettant d'enrichir la liste de gènes candidats pour l'étude de pathologies plaquettaires héréditaires non étiquetée avec les gènes des isotypes $\alpha 4A$ et $\alpha 8$.

Deuxième axe : les modifications post-traductionnelles de la tubuline

Hypothèse de départ. Les modifications post-traductionnelles de la tubuline ont été très peu étudiées dans la lignée plaquettaire, et leur présence et leurs rôles restent pour la plupart encore hypothétiques. **Dans cette deuxième partie, je me suis d'abord attaché à caractériser biochimiquement le répertoire de modifications post-traductionnelles de la tubuline dans la lignée plaquettaire. En parallèle, j'ai également commencé un travail de caractérisation de ces modifications sur le plan fonctionnel à l'aide de souris inactivées pour leurs enzymes respectives.**

Résultats principaux. La caractérisation biochimique fut réalisée sur des mégacaryocytes humains différenciés à partir de progéniteurs hématopoïétiques de sang périphérique CD34⁺. L'acétylation K40 des tubulines α reste stable au cours de la mégacaryopoïèse, malgré une augmentation croissante des transcrits de la désacétylase HDAC6. Elle reste toutefois à des niveaux très inférieurs à ceux des deux tissus de référence, à savoir le cerveau et les testicules de souris, suggérant que la majorité des tubulines mégacaryocytaires sont à l'origine déjà désacétylées et maintenues dans cet état par l'enzyme HDAC6. Par opposition, la détyrosination des tubulines α augmente progressivement au cours de la maturation des mégacaryocytes. Elle atteint son maximum dans le produit fini, les plaquettes, à des niveaux qui dépassent ceux des tissus de référence où elle joue déjà un rôle essentiel. Étant donné que les transcrits de l'enzyme détyrosinase VASH1 suivent la même cinétique d'expression croissante (VASH2 étant indétectable), il est raisonnable de penser qu'elle soit responsable de la mise en place de cette modification. Il est à noter toutefois qu'au moment de l'étude, l'enzyme détyrosinase MATCAP n'était pas encore identifiée (Landskron et al., 2022) : nous n'avons pour cette raison pas de donnée la concernant, et nous ne pouvons par conséquent pas exclure une potentielle implication de celle-ci dans le phénomène. Pour ce qui est des polymodifications, la glutamylation est de son côté très peu présente dans la lignée plaquettaire par rapport au cerveau et aux testicules. Plusieurs enzymes TTL et CCP sont toutefois exprimées au niveau transcriptionnel dans les mégacaryocytes, suggérant qu'elles puissent malgré tout avoir une implication fonctionnelle dans la mégacaryopoïèse. Enfin la glycylation, qui fut jusque-là rapportée pour n'être présente que

dans les cellules ciliées comme les spermatozoïdes, fut curieusement détectée sous la forme de chaînes longues dans le système plaquettaire.

L'acétylation K40 des tubulines α . D'après nos données, il semble que la modification soit délibérément maintenue à des niveaux très bas par la désacétylase HDAC6 lors de la mégacaryopoïèse. Il est ainsi légitime de s'interroger sur l'importance fonctionnelle de cette désacétylation massive. Toutefois, les souris inactivées pour l'enzyme HDAC6, chez qui les microtubules sont hyperacétylés ne révèlent aucun défaut particulier de biogenèse plaquettaire. De la même manière, les souris inactivées pour l'enzyme acétyltransférase ATAT1, chez qui les microtubules sont encore davantage hypoacétylés, ne montrent là encore aucun défaut, excluant ainsi toute implication de cette modification dans la lignée mégacaryocytaire. Il est à noter cependant que les plaquettes inactivées pour l'enzyme HDAC6 montrent un léger avantage cinétique en terme d'étalement sur une surface de verre, suggérant que cette enzyme puisse tout de même contrôler certains aspects de l'activation plaquettaire. HDAC6 modifie toutefois plusieurs substrats, comme la Heat-Shock Protein 90 qui serait impliquée dans la réponse plaquettaire (Lalo et al., 2012), rendant par conséquent difficile de conclure sur le rôle de l'acétylation des microtubules dans les fonctions plaquettaires. Dans l'ensemble, les résultats de notre caractérisation ainsi que des données rapportées dans la littérature, permettent de conclure que l'acétylation K40 de la tubuline α n'est pas essentielle dans les mégacaryocytes et les plaquettes. Nous noterons toutefois que la lysine K40 fut rapportée comme pouvant être triméthylée par l'enzyme à activité méthyltransférase SETD2 (Park et al., 2016). La modification serait notamment impliquée dans la mitose, et l'inactivation de l'enzyme SETD2 induirait un processus de polyploïdisation dans les fibroblastes embryonnaires de souris. Bien que sa présence reste à être évaluée dans les mégacaryocytes, il est possible que cette modification puisse i) limiter l'acétylation K40 des tubulines α et ; ii) être impliquée dans la biogenèse plaquettaire, peut-être dans l'initiation du processus d'endomitose. Pour finir, bien que la lysine K40 ait été le centre d'attention de cette étude, nous ne pouvons par contre pas conclure sur l'implication de l'acétylation d'autres lysines des tubulines (α et β) sur la lignée plaquettaire, pour lesquelles tout, y compris les enzymes, reste à être identifié. Nous mentionnerons au passage que des travaux non publiés du laboratoire

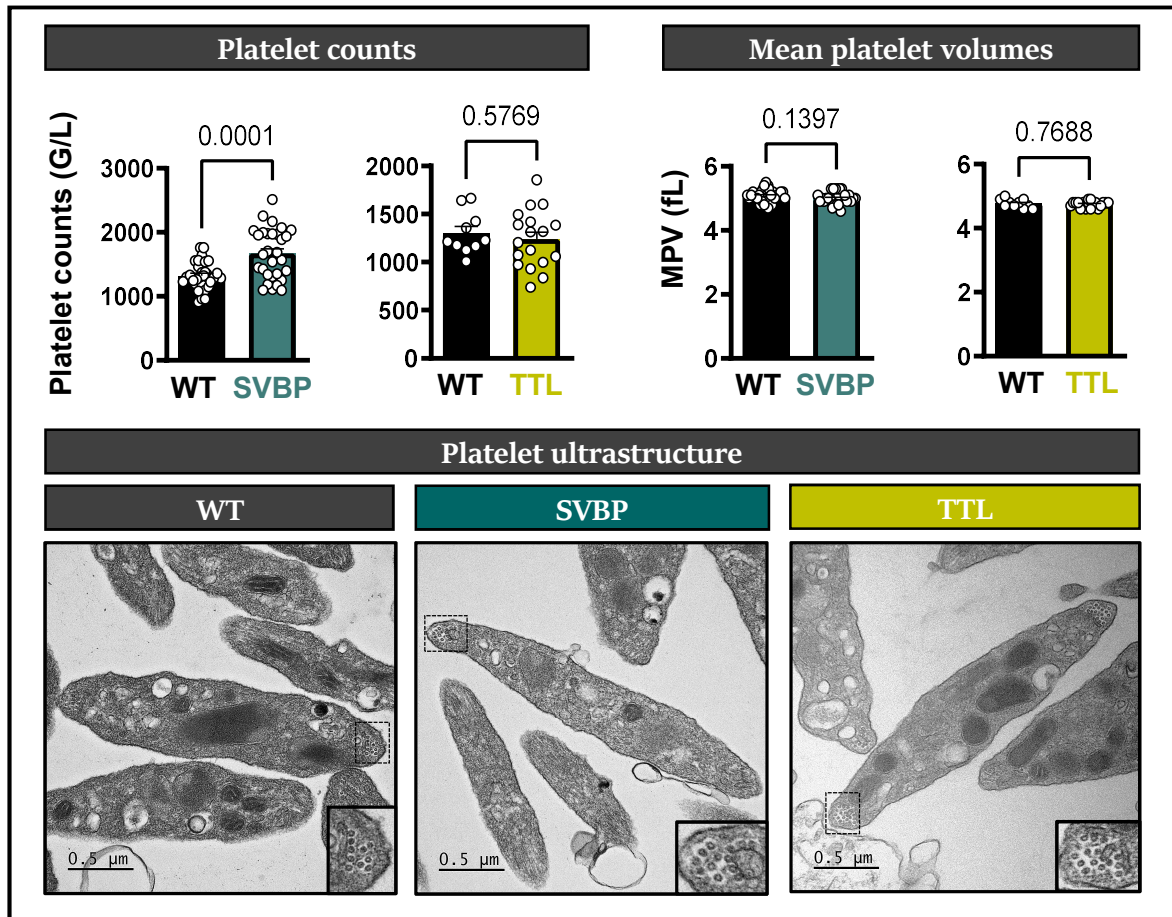


Figure 43 : Phénotype plaquettaire des souris totalement inactivées pour la protéine SVBP (KOSVBP) ou inactivées spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire pour la TTL (KO_{meg}TTL). (Haut) Numérations et volumes plaquettaires moyens des souris KOSVBP et KO_{meg}TTL. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Chaque symbole représente une souris. Les analyses statistiques ont été réalisées par un test de Student. (Bas) Images représentatives par microscopie électronique à transmission de plaquettes KOSVBP et KO_{meg}TTL en coupes transversales. Les encarts du coin inférieur droit représentent les microtubules de leur bande marginale.

suggèrent que d'autres lysines de tubuline (α et β) sont également acétylées dans la lignée plaquettaire. Nous ne savons toutefois pas quelle est leur implication fonctionnelle.

La détyrosination des tubulines α . La détyrosination est notamment impliquée dans le développement des structures cérébrales et la contractilité des cardiomyocytes (Pagnamenta et al., 2019; Robison et al., 2016). Rien n'est cependant connu de rôle dans la lignée mégacaryocytaire. D'après notre analyse, la détyrosination apparaît pourtant comme l'une des modifications les plus prometteuses pour la formation des plaquettes. Elle est de plus en plus présente au cours de la maturation des mégacaryocytes, atteignant des niveaux élevés qui dépassent ceux du cerveau de souris. Bien que nous ne disposions pas d'information au sujet de l'enzyme MATCAP, qui n'était pas encore identifiée au moment de notre étude, nous pouvons raisonnablement penser que l'enzyme VASH1 participe grandement au phénomène de détyrosination étant donnée la cinétique d'expression croissante de ses transcrits. Pour cette raison, nous nous sommes concentrés sur la caractérisation fonctionnelle des lignées de souris i) totalement inactivées pour la protéine SVBP (KOSVBP), dont la délétion est viable et rend inactif le complexe détyrosinase VASH et ; ii) les souris inactivées spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire pour l'enzyme tyrosinase TTL ($KO_{\text{meg}}\text{TTL}$). Les lignées de souris KOSVBP et $KO_{\text{meg}}\text{TTL}$ furent obtenues par collaboration avec les équipes de Marie-Jo Moutin et Carsten Janke, respectivement. Nous disposons ainsi d'une lignée dans laquelle la détyrosination progressive des microtubules au cours de la mégacaryopoïèse est soit bloquée (KOSVBP), soit accentuée ($KO_{\text{meg}}\text{TTL}$). Bien que leur caractérisation soit toujours en cours, nous noterons que les souris KOSVBP présentent une importante diminution du niveau de détyrosination plaquettaire (confirmant le rôle majeur de l'enzyme VASH/SVBP) accompagnée d'une augmentation de leur numération plaquettaire (**Figure 43**). L'ultrastructure ainsi que la bande marginale de leurs plaquettes étant normales (de même que leurs fonctions), le défaut pourrait prendre son origine au cours de la différenciation des mégacaryocytes. De manière intéressante, les souris $KO_{\text{meg}}\text{TTL}$ ne montrent à l'inverse aucun défaut plaquettaire apparent (**Figure 43**). La perte de la tyrosine C-terminale semble ainsi importante pour le processus de formation des plaquettes. Nous resterons toutefois prudents dans notre interprétation sur les souris KOSVBP. En effet, l'inactivation étant totale, nous ne pouvons pas exclure l'éventualité que l'augmentation de la numération plaquettaire soit la conséquence d'un signal anormalement

sécrété/exposé par une cellule médullaire environnante, agissant de manière paracrine sur les mégacaryocytes. L'inactivation spécifiquement dans la lignée plaquettaire de la protéine SVBP sera nécessaire pour asseoir avec certitude l'implication intrinsèque de cette modification dans le processus de mégacaryopoïèse.

La glutamylation des tubulines α et β . La glutamylation est une modification particulièrement importante dans le cerveau (Bodakuntla et al., 2021; Gilmore-Hall et al., 2019; Magiera et al., 2018) ou encore les cellules ciliées comme les spermatozoïdes (Konno et al., 2016). De manière générale, les niveaux de glutamylation restent très faibles dans la lignée plaquettaire par rapport à ceux retrouvés dans le cerveau ou les testicules, bien qu'une majorité des enzymes TTLLs et CCPs soient exprimées au niveau transcriptionnel. Nous pouvons toutefois observer une transition au cours de la maturation des mégacaryocytes : les chaînes de glutamate des tubulines β sont progressivement retirées, à l'inverse de celles des tubulines α qui apparaissent et s'allongent. De tels résultats soulèvent plusieurs questions, à savoir i) si les niveaux de tubulines glutamylées ne seraient pas activement maintenus à bas bruit dans les mégacaryocytes par les déglutamylases (suggérant qu'un excès soit incompatible avec le processus de mégacaryopoïèse) et ; ii) si cette transition n'aurait pas, malgré tout, une implication fonctionnelle dans la formation des plaquettes. D'après notre analyse transcriptionnelle, les enzymes qui seraient les plus à même d'influer sur ces deux paramètres sont la TTLL1 (initiation et élongation, tubulines α et β), la TTLL5 (initiation, tubulines α), la TTLL7 (initiation et élongation, tubulines β) et les déglutamylases CCP1 et CCP5. En collaboration avec l'équipe de Carsten Janke, nous avons pu commencer la caractérisation fonctionnelle de lignées déficientes pour certaines de ces enzymes. Nous avons notamment eu accès à des souris invalidées pour la TTLL1, ainsi que pour chacune des déglutamylases. Les souris ne présentent cependant aucun défaut de numération ou de volumes moyens plaquettaires, deux indicateurs d'un potentiel défaut de biogenèse plaquettaire. Les enzymes TTLL1 et CCPs semblent par conséquent, sur la base d'une invalidation génique unique, dispensables à la bonne manufacture des plaquettes sanguines. Il nous reste encore à explorer les pistes TTLL5 et TTLL7, pour lesquelles nous n'avons pas encore eu accès aux souris invalidées. Nous rappellerons qu'une étude pointe vers un rôle essentiel de la TTLL5 dans la

formation de protrusions cytoplasmiques s'apparentant à des proplaquettes dans un modèle de lignée cellulaire CHO exprimant une intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ constitutivement active (van Dijk et al., 2018). La TTLL5 constitue par conséquent l'une des enzymes les plus prometteuses d'un point de vue fonctionnel pour la lignée mégacaryocytaire. Enfin, étant donné la grande complexité du système enzymatique impliqué dans la glutamylation, il est fort probable qu'il faille recourir à des inactivations groupées de plusieurs enzymes pour étudier le rôle de cette modification dans la lignée mégacaryocytaire. Le développement récent de méthodes d'inactivation géniques par CrispR/Cas9 dans des progéniteurs hématopoïétiques humains, et leur différenciation en mégacaryocytes (Montenont et al., 2021), pourraient certainement permettre de s'affranchir de la génération de souris doublement ou triplement invalidées.

La glycylation des tubulines α et β . D'après la littérature, la glycylation n'est retrouvée que dans les cellules ciliées comme les spermatozoïdes. Nous étions toutefois très surpris de détecter la présence de chaînes de glycine longues ($>3\text{G}$) dans nos échantillons de mégacaryocytes humains, de surcroît à des niveaux comparables à ceux retrouvés dans le tissu de référence. Des observations similaires ont été récemment rapportée par une équipe anglaise dans des mégacaryocytes de culture obtenus à partir de cellules souches pluripotentes induites (Khan et al., 2022). De manière intéressante, la seule enzyme connue à ce jour pour allonger les chaînes de polyglycine est la TTLL10. Bien qu'active chez la souris, elle fut toutefois rapportée pour être à l'inverse inactive chez l'Homme en raison de deux mutations ponctuelles dans son site catalytique (Rogowski et al., 2009). Le signal de tubuline polyglycylée que nous avons détecté dans nos échantillons humains est par conséquent très étonnant. Il soulève deux questions majeures. La première concerne la spécificité du signal révélé par l'anticorps, car nous ne savons aujourd'hui pas s'il correspond réellement à de tubuline. En effet, la glycylation n'est pas spécifique aux tubulines et de nombreuses protéines ont été montrées pour porter cette modification (Rogowski et al., 2009). Puisque nous observons plusieurs bandes non spécifiques aux tubulines avec cet anticorps sur nos échantillons, il est par conséquent possible que le signal corresponde à celui d'une protéine polyglycylée de poids moléculaire proche ou équivalent à la tubuline. Des études complémentaires seront nécessaire pour répondre à cette interrogation, par spectrométrie de masse ou par Western Blot à partir tubuline plaquettaire purifiée par exemple.

DISCUSSION GÉNÉRALE

La présence de cette modification sur la tubuline poserait alors la question de son importance fonctionnelle dans la biologie plaquettaire. Il s'avère que des souris doublement inactivées pour les deux seules enzymes connues à ce jour pour initier les chaînes de glycine, à savoir TLL3 et TLL8, ont été récemment générées (Gadadhar et al., 2021). Elles pourront sans doute permettre d'évaluer la présence et l'importance fonctionnelle de la glycylation dans la lignée plaquettaire.

En conclusion, les travaux menés dans cette deuxième partie de thèse ont permis d'établir le répertoire des modifications post-traductionnelles de la tubuline, une donnée qui manquait à mon arrivée au laboratoire. Nous avons ensuite, sur la base de cette caractérisation, pu identifier les modifications les plus prometteuses en terme de fonctionnalité. La détyrosination, pour laquelle rien n'est encore aujourd'hui connu dans la lignée plaquettaire, retient particulièrement notre attention. Les souris inactivées pour le complexe détyrosinase montrent en effet une augmentation du chiffre plaquettaire, signant un potentiel défaut de production. Des études complémentaires sont en œuvre pour caractériser le défaut et l'inclure au manuscrit.

CONCLUSION

CONCLUSION

CONCLUSION

Les travaux menés lors de cette thèse ont d'abord une portée cognitive, en contribuant à compléter notre connaissance du rôle des isotypes de tubuline et de leurs modifications post-traductionnelles dans la biologie plaquettaire. **Ils esquissent ainsi l'ébauche d'un code tubuline spécifique à la lignée mégacaryocytaire, chez qui les tubulines $\alpha 4A$, $\alpha 8$ et $\beta 1$, ainsi que la détyrosination ressortent à présent comme des acteurs principaux.** L'ensemble des connaissances accumulées au cours de ce travail m'ont d'ailleurs permis de rédiger un article de revue sur le code tubuline dans la formation des plaquettes, pour lequel je suis 1^{er} auteur (Annexe 2). Bien que nous ayons contribué à l'identification et la caractérisation de certains éléments clés du code tubuline des mégacaryocytes et des plaquettes, les mécanismes exacts par lesquels ceux-ci régulent les comportements et les propriétés de leurs microtubules restent toujours inconnus. **En particulier, comment permettent-ils d'orchestrer les courbures si particulières des microtubules formant la bande marginale, qui apparaît maintenant comme clé dans les fonctions hémostatiques des plaquettes ?** En plus des caractéristiques intrinsèques modifiant les propriétés mécaniques des microtubules, comme pour la tubuline $\alpha 8$ (Belvindraha et al., 2017), ils pourraient également permettre une interaction préférentielle du polymère avec certaines MAPs. Nous suspectons notamment les protéines motrices de type kinésine, qui présentent la capacité de courber, voire de faire boucler sur eux-mêmes les microtubules *in vitro* (Gittes et al., 1996; Mitra et al., 2020). Il existe beaucoup d'isoforme de kinésine différents, ce qui rend par conséquent difficile leur caractérisation fonctionnelle. Nous noterons qu'une mutation homozygote récessive dans le gène de la kinésine-12 (aussi appelée KIF15) fut néanmoins associée à une thrombopénie chez l'Homme (Sleiman et al., 2017). Bien que les auteurs restent assez brefs sur le phénotype plaquettaire (le volume moyen ou encore l'ultrastructure plaquettaire n'ont pas été analysés), cette étude reste suffisante pour considérer cette KIF15 comme un potentiel candidat. Enfin, mis à part les protéines motrices, plusieurs MAPs structurales pourraient également être impliquées dans la formation des plaquettes et de leur bande marginale. En particulier, une étude récente s'est attachée à comparer l'influence de 45 MAPs différentes sur le cytosquelette de microtubules dans la lignée cellulaire U2-OS (Jijumon et al., 2022). De manière intéressante, certaines MAPs semblent capables d'induire la formation de faisceaux de microtubules à géométrie courbée, comme DCX, CCDC66 ou MAP2D. Elles rappellent ainsi le comportement des microtubules des mégacaryocytes de culture ou ceux de la bande marginale plaquettaire, ajoutant par conséquent

CONCLUSION

de nouvelles entrées sur notre liste de MAPs candidats. Dans l'ensemble, beaucoup de travail doit encore être réalisé afin de comprendre les tenants et les aboutissants du code tubuline dans la lignée mégacaryocytaire. De tels efforts permettraient ainsi une meilleure compréhension de la biologie plaquettaire. En plus d'une portée cognitive, ils s'inscriraient également dans des perspectives plus appliquées, notamment i) dans l'amélioration du procédé de production de plaquettes de culture à visée transfusionnelle, un projet majeur du laboratoire ou ii) en clinique, permettant un meilleur diagnostic et/ou une prise en charge adaptée des patients atteints de pathologies plaquettaires héréditaires non étiquetée. Enfin, bien que focalisées sur un type cellulaire et un processus physiopathologique très précis, l'ensemble de ces données pourraient être étendues dans d'autres systèmes cellulaires pour générer de nouveaux concepts dans le domaine des microtubules.

ANNEXES

Annexe 1

*Article : An essential role for
 α 4A-tubulin in platelet biogenesis*

Research Article



An essential role for α 4A-tubulin in platelet biogenesis

Catherine Strassel¹, Maria M Magiera^{2,3} , Arnaud Dupuis¹ , Morgane Batzenschlager¹ , Agnès Hovasse⁴, Irina Pleines^{5,6}, Paul Guéguen⁷, Anita Eckly¹, Sylvie Moog¹, Léa Mallo¹, Quentin Kimmerlin¹, Stéphane Chappaz^{5,6}, Jean-Marc Strub⁴, Natarajan Kathiresan^{2,3}, Henri de la Salle¹, Alain Van Dorsselaer⁴, Claude Ferec⁷, Jean-Yves Py⁸ , Christian Gachet¹, Christine Schaeffer-Reiss⁴, Benjamin T Kile^{5,6} , Carsten Janke^{2,3} , François Lanza¹ 

During platelet biogenesis, microtubules (MTs) are arranged into submembranous structures (the marginal band) that encircle the cell in a single plane. This unique MT array has no equivalent in any other mammalian cell, and the mechanisms responsible for this particular mode of assembly are not fully understood. One possibility is that platelet MTs are composed of a particular set of tubulin isotypes that carry specific posttranslational modifications. Although β 1-tubulin is known to be essential, no equivalent roles of α -tubulin isotypes in platelet formation or function have so far been reported. Here, we identify α 4A-tubulin as a predominant α -tubulin isotype in platelets. Similar to β 1-tubulin, α 4A-tubulin expression is up-regulated during the late stages of megakaryocyte differentiation. Missense mutations in the α 4A-tubulin gene cause macrothrombocytopenia in mice and humans. Defects in α 4A-tubulin lead to changes in tubulin tyrosination status of the platelet tubulin pool. Ultrastructural defects include reduced numbers and misarranged MT coils in the platelet marginal band. We further observed defects in megakaryocyte maturation and proplatelet formation in *Tuba4a*-mutant mice. We have, thus, discovered an α -tubulin isotype with specific and essential roles in platelet biogenesis.

DOI [10.26508/lsa.201900309](https://doi.org/10.26508/lsa.201900309) | Received 16 January 2019 | Revised 23 January 2019 | Accepted 23 January 2019 | Published online 13 February 2019

Introduction

Blood platelets are produced by megakaryocytes (MKs) in the bone marrow and are essential to arrest bleeding in mammals. In the final stages of platelet biogenesis, microtubules (MTs) are arranged into a submembranous structure, the marginal band, which encircles the platelets in a single plane. This circular scaffold is essential for maintaining the flattened lenticular shape of platelets

(1, 2) and has no equivalent in any other mammalian cell. The biological importance of the marginal band has been demonstrated by the observation that MT depolymerization with colchicine, or by cold exposure, induces a transition of platelets to a spherical shape and alters platelet function (3). In addition, decreased platelet counts and enlarged spheroid platelets have been observed in patients and animals with genetic deficiencies in the platelet-specific β 1-tubulin isotype (4, 5).

MTs in platelets undergo dramatic bending when forming the marginal band; however, the underlying mechanisms remain to be elucidated. When MKs are differentiated in culture, MT coiling in the extending pseudopods occurs during proplatelet formation. Pseudopods show platelet-sized swellings at their extremities, which will later bud off as platelets (6). The dynamics of MT growth and sliding in proplatelets depend on the dynein/dynactin motor complex (7, 8), but it is unclear how MT ring formation and maintenance is regulated.

The particular mode of MT assembly in platelets suggests that tubulin building blocks might have unique biochemical and structural properties. In humans, nine α -tubulin and nine β -tubulin genes encode a variety of tubulin isotypes (9). Within the α - and the β -tubulin families, isotypes show more than 90% amino acid identity, with the notable exception of β 1-tubulin. The gene encoding this particular isotype, *TUBB1*, was initially cloned from a bone marrow cDNA library (10) and subsequently demonstrated to be specifically expressed in MKs and platelets (11). It is now clear that incorporation of β 1-tubulin into platelet MTs is critical for the formation of the marginal band and, therefore, for platelet formation and function. It is one of the most striking examples of a functional specialized, unique, and essential role for a tubulin isotype. Other isotypes have also been found to be specifically incorporated into selected MTs, such as β 3-tubulin in neurons (12, 13), or β 4-tubulin in cilia and flagella (14, 15).

¹Université de Strasbourg, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Etablissement Français du Sang Grand Est, Unité Mixte de Recherche-S 1255, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Strasbourg, France ²Institut Curie, Paris-Sciences-et-Lettres Research University, CNRS UMR3348, Orsay, France ³Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, CNRS UMR3348, Orsay, France ⁴Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, CNRS UMR7178, Université de Strasbourg, Strasbourg, France ⁵ACRF Australian Cancer Research Foundation Chemical Biology Division, the Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Parkville, Australia ⁶Anatomy and Developmental Biology, Monash Biomedicine Discovery Institute, Monash University, Melbourne, Australia ⁷Laboratoire de génétique moléculaire et d'histocompatibilité, Centre Hospitalier Régional et Universitaire Morvan, INSERM U1078, EFS Bretagne, Brest, France ⁸EFS Centre-Pays de la Loire, site d'Orléans, France

Correspondence: francois.lanza@efs.sante.fr; Carsten.Janke@curie.fr
Natarajan Kathiresan's present address is Physiology and Biomedical Engineering, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

The mechanical properties of MTs are thought to be predominantly governed by lattice interactions (16). As such, it might be expected that they could be altered by the incorporation of a particular set of tubulin isotypes into the lattice (17). Although the essential role of β 1-tubulin for platelet MTs has so far only been determined by genetic approaches, it is highly likely that its incorporation changes the mechanical and dynamic properties of platelet MTs.

Strikingly, nothing is known about the role of α -tubulin isotypes in platelets and MKs. The reason for the lack of insight into the α -tubulin repertoire is most likely related to the fact that so far, no reliable methods are available to quantitatively characterize the composition of the tubulin isotype pool, and that DNA and peptide sequences of α -tubulin isotypes are even more similar among each other than those of β -tubulins, making quantitative analyses challenging. To detect isotypes that could be important for platelet biogenesis, we investigated the composition of the tubulin isotype pool of platelet MTs with a specific focus on the yet unexplored α -tubulin isotypes. Using quantitative proteomics, we found a strong enrichment of α 4A-tubulin in platelets. The expression of α 4A-tubulin is up-regulated during the late stages of MK differentiation, and we found an enrichment of α 4A-tubulin in platelets. This is reminiscent of the profile of β 1-tubulin expression, suggesting that α 4A-tubulin plays essential roles in platelets.

Indeed, mice carrying a missense mutation in the *Tuba4a* gene, and a patient with a monoallelic double missense mutation in the *TUBA4A* gene displayed macrothrombocytopenia and structural abnormalities in the marginal band of platelets. In addition, defective MK maturation and proplatelet formation were observed in the mutant mouse model. The fact that these phenotypes are highly similar to the β 1-tubulin-mutant phenotypes implies a similarly essential role of α 4A-tubulin in late stages of platelet biogenesis.

Materials and Methods

Mice

Plt68 mice carrying a mutant *Tuba4a* allele were generated. Male BALB/c mice were injected i.p. with 85 mg/kg N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) weekly for 3 wk and rested for 12 wk before mating with untreated BALB/c females to produce first-generation progeny. Blood was taken at 7 wk of age, and animals exhibiting aberrant platelet counts and morphology were test-mated to determine heritability of the phenotype. Confirmed mutant strains were backcrossed for 10 generations to the BALB/c background to breed out irrelevant ENU-induced mutations.

Reagents

Polyclonal antisera against mouse β 1-tubulin (pAb5274) and human/mouse α 4A-tubulin (pAb7620 and pAb7621) were generated by immunizing against peptides 451-VLEEDVEVTEEAEMEPDKGH-471 and 76-DEIRNGPYR-84, respectively.

2D-gel electrophoresis and liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry analysis of platelet tubulin

2D-gel electrophoresis was performed according to Magnin-Robert et al (18). Spots of interest were extruded and submitted to in-gel digestion (19) and then processed for mass spectrometry as described in the Experimental Procedures section of the Supplementary Information.

LC-Single Reaction Monitoring (SRM) quantification of α -tubulin isotypes

For LC-SRM assay, proteotypic peptide (EIIDPVLDR and DVNVAIAAIK) signatures of α 4A- and α 8-tubulin, respectively, and one peptide (NLDIERPTYTNLNR) common to all α -tubulins were selected. The samples were processed for LC-SRM quantification as described in the Experimental Procedures section of the Supplementary Information.

MK culture

Human CD34⁺ cells were cultured as described previously (20). Mouse bone marrow Lin⁻ cells were cultured as described previously (21). Additional information is provided in the Experimental Procedures section of the Supplementary Information.

Proplatelet formation in bone marrow explants

Marrows from femurs were flushed and cut in transverse sections of 0.5 mm. MKs were observed after 6-h incubation at 37°C, at the periphery of the tissue as described previously (22).

Immunofluorescence microscopy

Blood was obtained from anesthetized mice and platelets were washed according to Cazenave et al (23). Platelets were fixed in 4% PFA, cytospun onto poly-L-lysine-coated slides and processed for immunofluorescence microscopy as described in the Experimental Procedures section of the Supplementary Information.

Western blotting

Proteins, corresponding to 10⁷ platelets or 300 ng of purified tubulins were separated on 4%–15% or 10% SDS gels for separation of α and β -tubulin (24), blotted onto polyvinylidene difluoride membranes, and processed for Western blotting as described in the Experimental Procedures section of the Supplementary Information.

Screening and gene sequencing of blood donors

Blood donors with a platelet count below 150 G/L were selected, DNA extracted from buccal swabs, and 17 selected genes suspected to be implicated in thrombocytopenia, including *TUBA4A*, were amplified by PCR using amplimers encompassing the coding sequences, intron–exon junctions, and 5' and 3' UTR (ABC study approved by ANSM-French agency for the safety of drugs and health products registered under identification number RCB: 2014-A00002-45; informed consent was obtained for each individual).

Statistical analyses

Results were expressed as the mean (\pm SEM) and statistical comparisons were performed using an unpaired, two-tailed *t* test or a one-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test.

Results

Analysis of the α -tubulin isotype repertoire in circulating platelets and during megakaryopoiesis

Previous studies in mouse have reported an up-regulation of β 1-tubulin expression during megakaryopoiesis and estimated that this isotype represented a large proportion of total β -tubulin pool in circulating platelets (5). In contrast, a quantification of α -tubulin isotypes in platelets and MKs has so far not been performed. In a first series of experiments, we established the full repertoire of α -isotypes by nanoLC-MS/MS analysis. Tubulin purified from human platelets was separated by 2D electrophoresis as described in Adessi et al (25), and the main Coomassie-stained spots (Fig 1A) were dissected and submitted to nanoLC-MS/MS analysis. We identified α 1C-, α 3C/D-, α 3E-, α 4A-, and α 8-tubulin isotypes. This represents virtually all known α -isotypes, bearing in mind that highly similar isotype groups are not distinguishable with this method.

To determine the dynamics of α -tubulin isotype expression, we quantified mRNA levels during MK differentiation of human CD34⁺ cells (20). Tubulin isotypes within highly homologous subgroups (*TUBA1* and *TUBA3*) were analyzed together using cross-reactive primers. The expression of isotypes from the *TUBA1* group was already detected at D0, increased early during differentiation (D4), and then remained stable until full maturation (D12; Fig 1B). In contrast, expression of *TUBA4A* and *TUBA8* transcripts progressively increased from D4 until D12, a stage just preceding proplatelet extension and marginal band formation. *TUBA3* transcripts were not detected throughout differentiation (data not shown). Strikingly, the expression profile of *TUBA4A* and *TUBA8* mirrors *TUBB1*, thus providing a further indication for the potential functional complementarity of these isotypes.

To determine the prevalence of α 4A- and α 8-tubulin isotypes at the protein level, we submitted tubulin purified from human platelets to a quantitation assay using a targeted mass spectrometry approach called SRM with quantified stable isotope-labeled peptides (AQUA peptides) as internal standards (26). Using specific signatures from α 4A- and α 8-peptides, and normalizing them to a common peptide shared by all α -tubulin isotypes, LC-SRM analysis showed a sizable fraction of α 4A-tubulin ($29 \pm 6\%$, $n = 6$), but only low levels of α 8-tubulin ($2.0 \pm 1.4\%$, $n = 6$) in the platelet tubulin pool (Fig 1C). This is striking as so far α 4A-tubulin had been reported to be expressed in many tissues, however, generally at low transcript levels compared with other α -tubulins (27).

Using an α 4A-tubulin-specific antibody that we had raised against a sequence unique to α 4A-tubulin (76-DEIRNGPYR-84, pAb7621), we compared the level of α 4A-tubulin in MTs purified from platelets, brain tissue, and HeLa cells. Western blot analysis

revealed that the levels of α 4A-tubulin in platelet MTs are well above those in HeLa cells and also higher than those in brain (Fig 1D). This confirmed that α 4A-tubulin is particularly enriched in platelet MTs and indicates that it might play a particular role in the formation of the marginal band.

A missense mutation in *Tuba4a* gene causes macrothrombocytopenia and abnormal marginal band formation in mice

To establish the role of α 4A-tubulin in the formation of the marginal band, we analyzed a mouse strain (named *Plt68*) that we had identified from an ENU mutagenesis screen. *Plt68* mice exhibited decreased platelet counts (a 21% reduction compared with wild-type mice, $943 \times 10^3/\mu\text{l}$ versus $1,199 \times 10^3/\mu\text{l}$; Fig 2A). In addition, platelets from these mice exhibited an increased size with mean platelet volumes (MPV) representing 143% of those in wild-type mice (7.0 fL versus 4.9 fL; Fig 2B).

Exome sequencing of two *Plt68* animals, followed by genotyping of candidate mutations in siblings and offspring revealed that the *Plt68* phenotype correlated with inheritance of a point mutation in the *Tuba4a* gene. The mutation is predicted to encode a valine-to-glutamate substitution at position 260 of α 4A-tubulin (P68366; Fig 2C).

We next examined the ultrastructure of *Tuba4a*^{V260E/V260E} platelets by scanning and transmission electron microscopy. This analysis confirmed the increased size of the platelets and revealed the loss of their typical flat, discoid shape (Fig 2D). Close-up views of transmission electron microscopy (TEM) cross sections (Fig 2E) revealed a reduction in the number of MT coils in the marginal band of *Tuba4a*^{V260E/V260E} platelets (average 5 ± 1.0 coils/platelet compared with 11 ± 0.6 coils in the wild-type). Similar defects have been described for mice lacking β 1-tubulin (5) (Fig S1) or patients harboring mutations in the *TUBB1* gene (4). Consequently, these results imply that α 4A-tubulin has, similar to β 1-tubulin, an essential role in the formation of the marginal band during platelet biogenesis.

Naturally occurring mutations of *TUBA4A* in a human individual with moderate macrothrombocytopenia

To determine whether these observations in mice are relevant to humans, we screened for *TUBA4A* mutations in individuals presenting with low platelet counts. Blood donors with subthreshold platelet counts ($<150 \times 10^3/\mu\text{l}$) were subjected to targeted sequencing of genes possibly implicated in thrombocytopenia. One individual was identified with a monoallelic c.541G>A and c.547G>C double substitution in *TUBA4A* predicting p.Val181Met and p.Glu183Gln mutations in α 4A-tubulin (Fig 3A). These mutations were confirmed by Sanger sequencing. Database searches indicated that they correspond to very rare variants, with frequencies of 8×10^{-5} and 2×10^{-5} for c.541G>A (rs757373635) and c.547G>C (rs775821469), respectively.

Platelet counts recorded for the patient between 2008 and 2017 ($n = 26$) ranged between 137 and $164 \times 10^3/\mu\text{l}$, but MPVs were not available. Follow-up evaluation of the blood parameters confirmed a platelet count at the lower limit of normal values ($158 \times 10^3/\mu\text{l}$), considering normal ranges for platelet counts of $172\text{--}398 \times 10^3/\mu\text{l}$ in a French adult male population (16–59 y: $n = 17,646$) (28) and

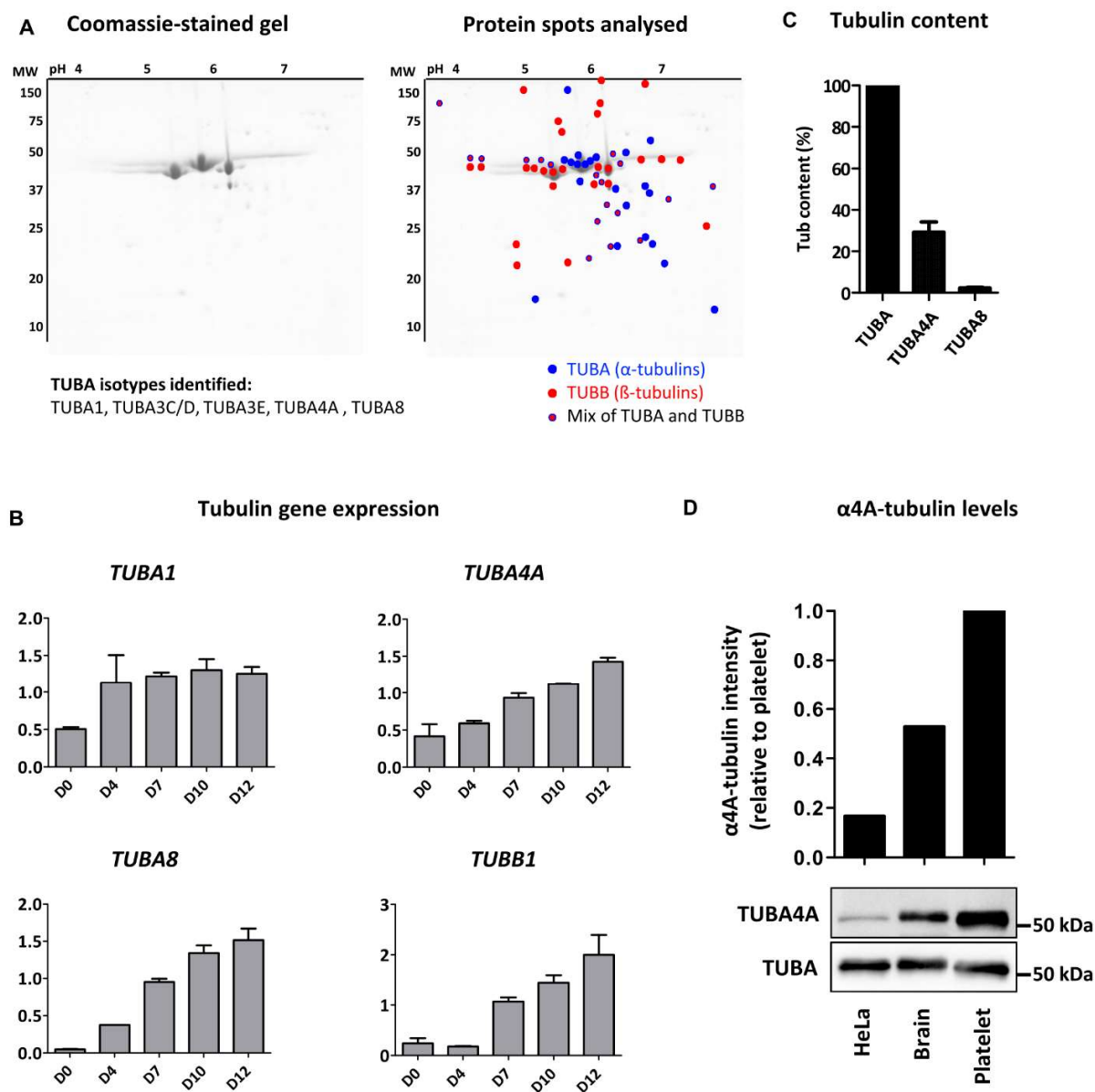
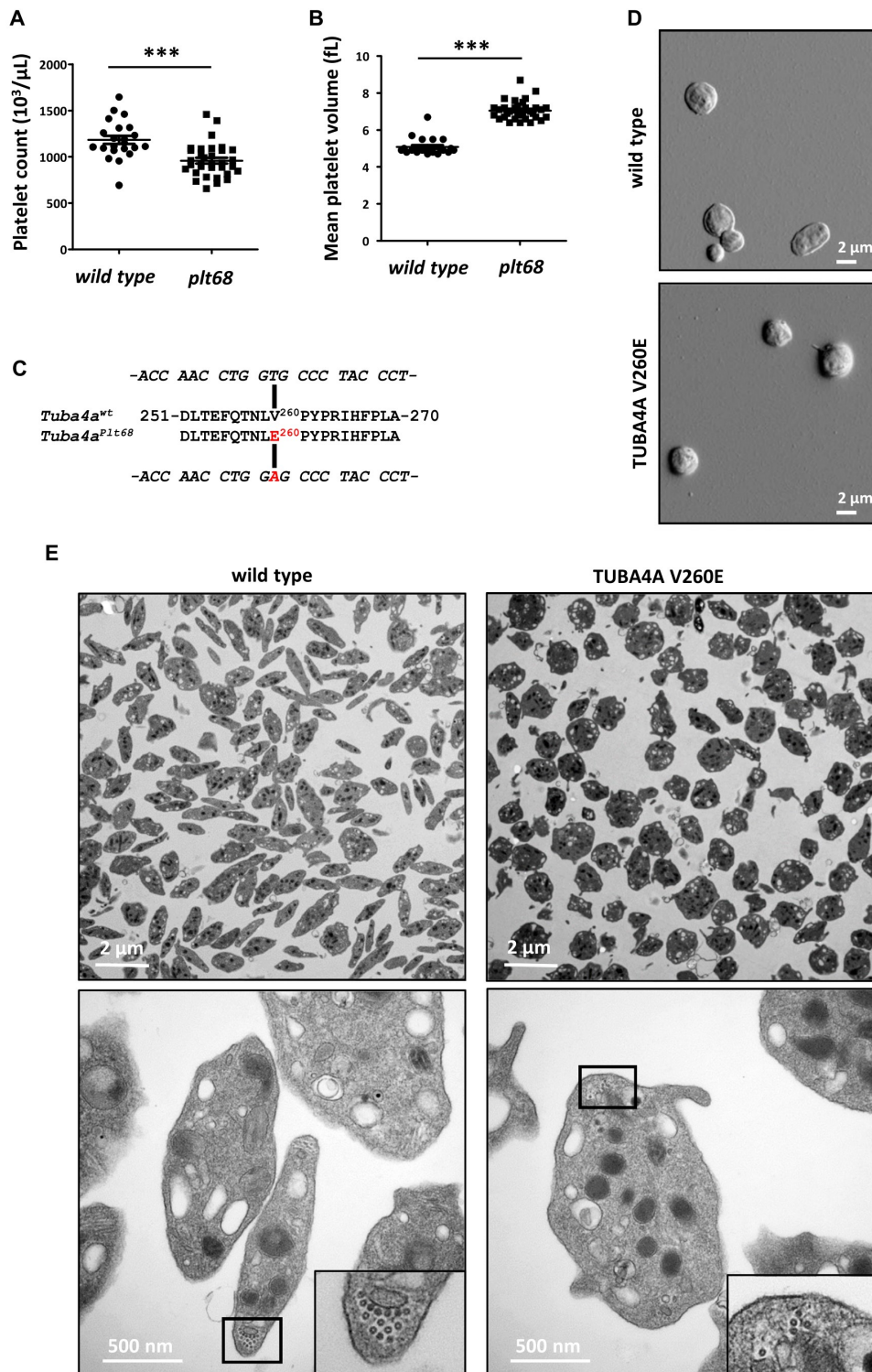


Figure 1. Expression of α -tubulin isotypes in platelets and during megakaryopoiesis.

(A) 2D-gel electrophoresis of tubulins purified from human platelets and list of identified α -isotypes. The isotypes were identified by LC-MS/MS analysis of the color-marked spots (blue, red, and double labelling correspond to spots containing α -, β -, and $\alpha\beta$ -isotypes, respectively). (B) Evolution of α 1-, α 4A-, α 8-, and β 1-tubulin transcripts at different stages of MK differentiation. RT-PCR amplification of RNA isolated from MKs differentiated from human CD34⁺ progenitor cells at days 0 to 12 of culture. Bands were quantified on gels and intensity normalized to 18S (mean \pm SEM, n = 3). (C) SRM-MS quantification of the α 4A- and α 8-tubulin isotypes in tubulin purified from human platelets. The content normalized to the total α -tubulin content was calculated as described in the methods from six separate tubulin preparations with analyses performed in triplicate. (D) Western blot analysis of α 4A-tubulin levels in tubulin purified from platelets, the brain, and HeLa cells. (Upper panel) Quantification of α 4A-tubulin levels in HeLa and brain tubulin relative to platelet tubulin after normalization to the total α -tubulin content. (Lower panel) Representative blot where equivalent amounts of purified tubulin (300 ng) were separated on a 10% gel and probed using pAb7621 polyclonal Ab specific for α 4A-tubulin and DM1a mouse mAb recognizing all the α -tubulin isotypes.



revealed an increased mean platelet volume (12.9 fL; normal range: 7.8–10.8 fL) (28). Electron microscopy analyses of the patient's platelets revealed similar defects to those in *Tuba4a*^{V260E/V260E} mice with a loss of the typical flat, discoid shape (Fig 3B and C). TEM cross sections did not, however, reveal a decrease in the number of MT per platelet (10.9 ± 0.4 for patient versus 11.4 ± 0.5 for control), but rather a profound disorganization of the marginal band, featuring loosely assembled MTs (Fig 3C). Together with the results of our mouse model, these findings strongly support an evolutionarily conserved key role of α 4A-tubulin in platelet biogenesis.

Effect of *Tuba4a* mutations on α 4A-tubulin expression and on tyrosination of the α -tubulin pool

We next evaluated the consequences of *Tuba4a*^{V260E} and *TUBA4A* mutations on the expression of α 4A-tubulin by Western blotting using isotype-specific antibodies. Although we detected a specific 55-kD protein band in platelet extracts from wild-type mice (Fig 4A) and normal human individuals (Fig 4B), this band was not detected in platelet extracts from *Tuba4a*^{V260E/V260E} mice, and the signal was decreased in extracts from the patient. qRT-PCR performed in cultured MK did not reveal a decrease in *Tuba4a* transcript levels in *Tuba4a*^{V260E} mice and additionally confirmed the increase of *Tuba4a* during differentiation (Fig S2), as in human cultured MK. Consistent with this, a dramatic reduction in labelling of the marginal band using the α 4A-tubulin antibodies was observed in mutant platelets relative to those from wild-type mice (Fig 4C) or human control individuals (Fig 4D). Other α -tubulin isotypes were present at relatively normal levels in extracts from *Tuba4a*^{V260E/V260E} mice and the patient, as seen with the pan- α -tubulin DM1A antibody (29). The fact that overall α -tubulin levels are unaltered in the absence of *Tuba4A* is most likely related to the adaptation of the expression levels of the remaining α -tubulin isotypes (30, 31). We also determined the expression of β 1-tubulin and found no obvious changes.

The nearly complete absence of α 4A-tubulin in *Tuba4a*^{V260E/V260E} mice could be caused by the misfolding of the protein and subsequent degradation. We thus performed 3D modelling of *Tuba4a*^{V260E/V260E}, which shows that the V260E mutation is situated within the core region of the protein (Fig S3). Thus, the substitution of hydrophobic valine by a charged glutamate might destabilize the entire core region, thereby affecting the conserved tubulin fold, leading to misfolded tubulin being degraded (32).

Compared with other α -tubulins, α 4A-tubulin shows a rather high level of sequence conservation. However, an outstanding feature of α 4A-tubulin is the lack of a C-terminal tyrosine residue, which is present on all other α -tubulin isotypes (or substituted by a functionally similar phenylalanine). Tyrosinated α -tubulin isotypes

can undergo enzymatic posttranslational detyrosination and retyrosination, and strict regulation of this “tyrosination cycle” is essential for a variety of MT functions (reviewed in reference 33). A strong expression of α 4A-tubulin might significantly increase the initial levels of detyrosinated tubulin in MKs and platelets, thus affecting tyrosination-dependent MT functions. We examined the levels of tyrosinated and detyrosinated tubulin in platelets of *Tuba4a*^{V260E/V260E} mice and from the patient. Western blotting analysis with an antibody directed against tyrosinated α -tubulin (Tyr-tubulin) showed stronger labelling in both cases relative to controls which implies a significant increase in tyrosination of the α -tubulin pool (Fig 4A and B). Conversely, the level of detyrosinated tubulin was decreased in *Tuba4a*^{V260E/V260E} platelets, but less so in the patient's platelets. It thus appears that the high proportion of detyrosinated α -tubulin in wild-type platelets might primarily be the result of the strong expression of α 4A-tubulin in platelets, and absence or reduction of this isotype strongly affects the levels of this otherwise posttranslationally controlled modification of tubulin.

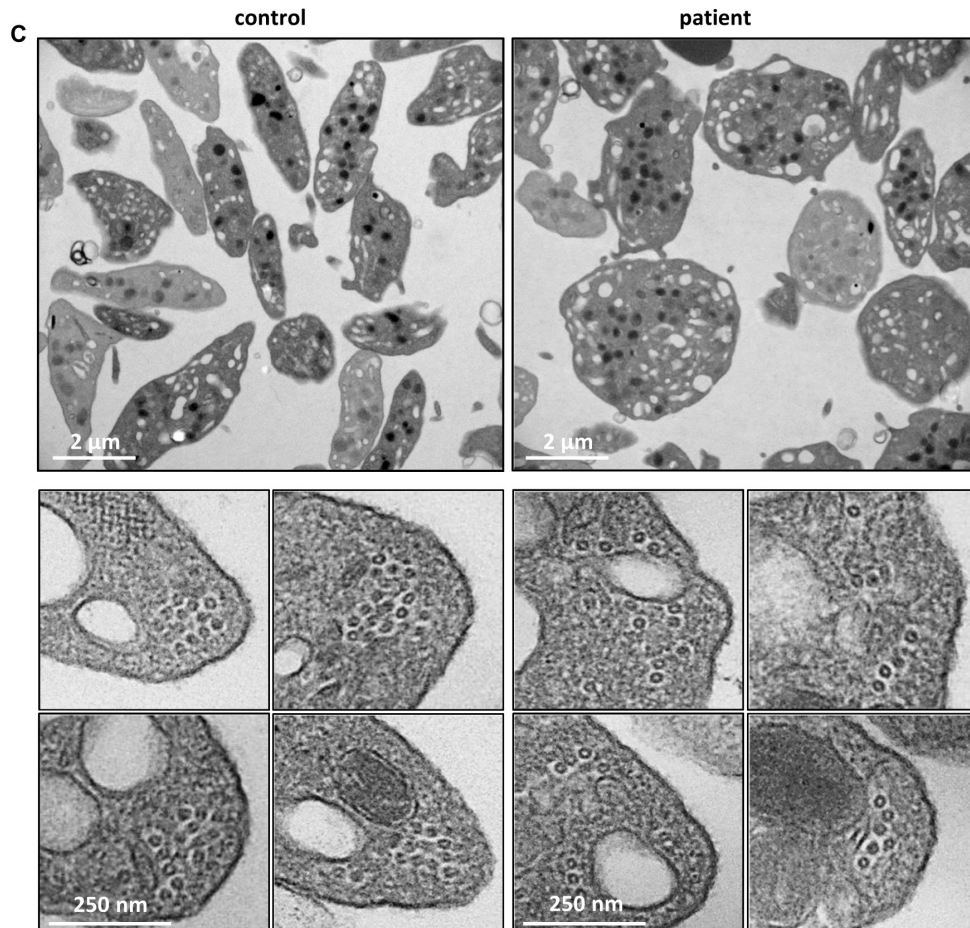
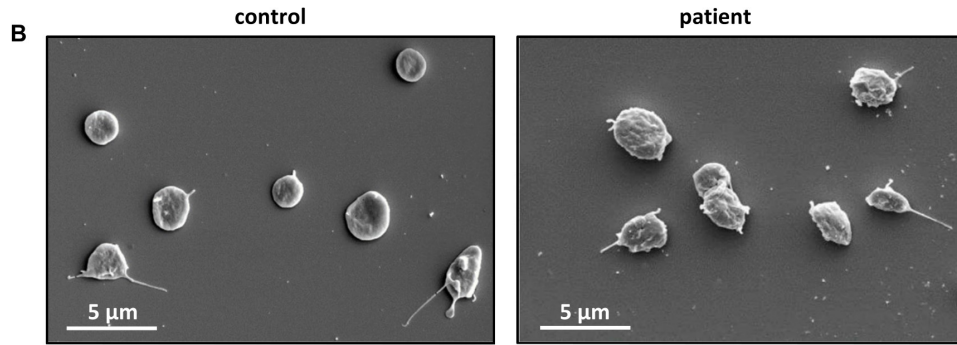
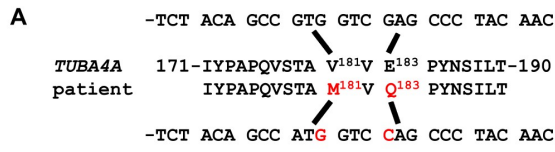
Acetylation is another tubulin posttranslational modification present in native resting platelets (34). It has been proposed to play a regulatory role during platelet activation and shape change (35), whereas its role in platelet biogenesis is still debated (36, 37). We verified the levels of tubulin acetylation between wild-type and *Tuba4a*^{V260E/V260E} platelets but could not detect significant differences (Fig S4). This suggests that tubulin acetylation is not involved in the defects observed in *Tuba4a*^{V260E/V260E} mice.

α 4A-tubulin-deficient MKs have a reduced capacity to extend proplatelets

To determine the impact of α 4A-tubulin deficiency on the process of platelet formation, we analyzed each step of megakaryopoiesis in *Tuba4a*^{V260E/V260E} mice. The bone marrow showed a normal cellular distribution of morphologically distinguishable MKs (stages I–III; Fig 5A), and no ultrastructural defects were noted in the less mature MKs (stages I–II). In contrast, a notable proportion (~30%) of stage III MKs exhibited an abnormal structure with a more compact demarcation membrane system (Fig 5B). When we examined the capacity of bone marrow-derived MKs to extend proplatelets by real-time analysis of fresh bone marrow explants (22), we noted a profound defect in *Tuba4a*^{V260E/V260E} MKs: MKs from these mice were unable to extend well-developed proplatelets, which are typically observed in wild-type MKs at this stage (Fig 6A). Most of the *Tuba4a*^{V260E/V260E} MKs retained a spherical shape during the 360-min course of observation, and only a small proportion extended a few thick protrusions. This phenotype is characteristic for defective proplatelet formation.

Figure 2. An ENU-induced mutation of *Tuba4a* causes macrothrombocytopenia and abnormal marginal band formation.

(A) Decreased platelet counts in *Plt68* mice. The number of circulating platelets in wild-type and *Plt68* mice is represented for each individual mouse (1,199 ± 183 versus 943 ± 207 × 10³ platelets/μl, respectively; mean ± SEM n = 21 wild type and n = 33 *Plt68*; ***P = 0.0026; t test). **(B)** Increased platelet volume in *Plt68* mice. The mean platelet volume in wild-type and *Plt68* mice is represented for each individual mouse (4.9 ± 0.34 versus 7.0 ± 0.17 fL respectively; mean ± SEM n = 21 and n = 33; ***P < 0.0001; t test). **(C)** Schematic representation of the V260E mutation: A mutation was identified in the gene encoding α 4A-tubulin (*Tuba4a*) in the *Plt68* strain resulting in a Val-to-Glu transition at position 260 of the protein (P68366). **(D)** Representative scanning electron microscopy images of wild-type and *Tuba4a*^{V260E/V260E} platelets. **(E)** Representative transmission electron microscopy images of wild-type and *Tuba4a*^{V260E/V260E} platelet suspensions (upper panels) and close-up views of individual platelets in cross section (lower panels).



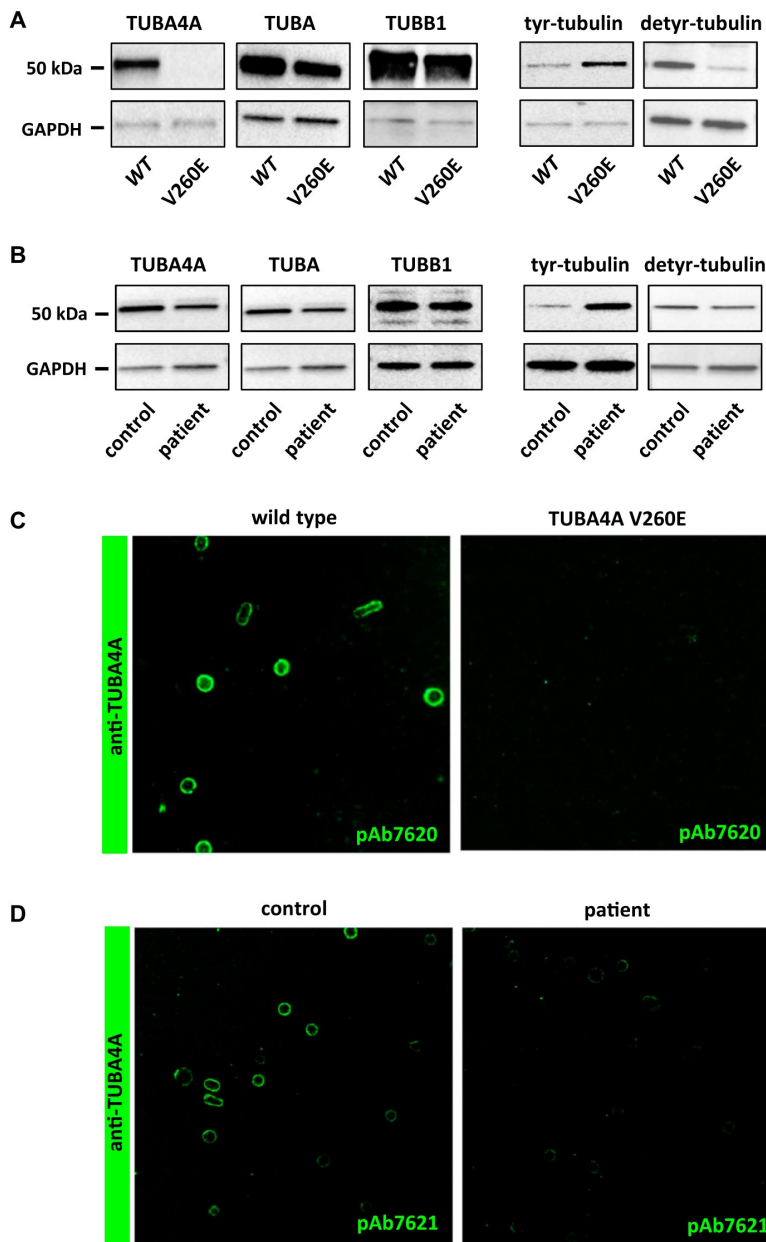


Figure 4. Effect of Tuba4a mutations on α 4A-tubulin expression and on tyrosination of the α -tubulin pool. (A) α 4A-tubulin is not detected in platelets from *Tuba4a*^{V260E/V260E} mice and the α -tubulin pool is hypertyrosinated. Platelet lysates from wild-type and *Tuba4a*^{V260E/V260E} mice were separated by SDS-PAGE and probed with pAb7621 against α 4A-tubulin, DM1a recognizing all the α -tubulin isotypes, pAb5274 against β 1-tubulin, 1A2 against tyrosinated α -tubulin, or 1D5 against detyrosinated α -tubulin. Blots were also probed for GAPDH as a loading control. Representative of four separate experiments. (B) α 4A-tubulin is decreased in platelets from the patient and the α -tubulin pool is hypertyrosinated. Platelet lysates from a control individual and the patient were processed as in (A). (C, D) Decreased α 4A-tubulin labelling in the marginal band of platelets from *Tuba4a*^{V260E/V260E} mice (C) and the patient (D). Platelets were fixed in PFA-Triton X-100, captured on poly-L lysine-coated slides, incubated with pAb7620 or pAb7621 against α 4A-tubulin and revealed with GAR-Alexa 488.

We next examined the impact of α 4A-tubulin deficiency in MKs differentiated from Lin⁻ bone marrow progenitors in vitro (21). Strikingly, a defect similar to that observed in explants was

observed after 4 d in culture, a time point at which proplatelet formation takes place (Fig 6B). Almost 40% of *Tuba4a*^{V260E/V260E} MKs extended only few thick protrusions, indicative of poorly

Figure 3. Naturally occurring mutations of TUBA4A in an individual with mild macrothrombocytopenia.

(A) A double substitution was identified in TUBA4A in the patient, resulting in p.Val181Met and p.Glu183Gln changes in α 4A-tubulin. (B) Representative scanning electron microscopy images of control and patient's platelets. (C) Representative transmission electron microscopy images of control and patient's platelet suspensions (upper panels) and close-up views of individual platelets in cross section (lower panels).

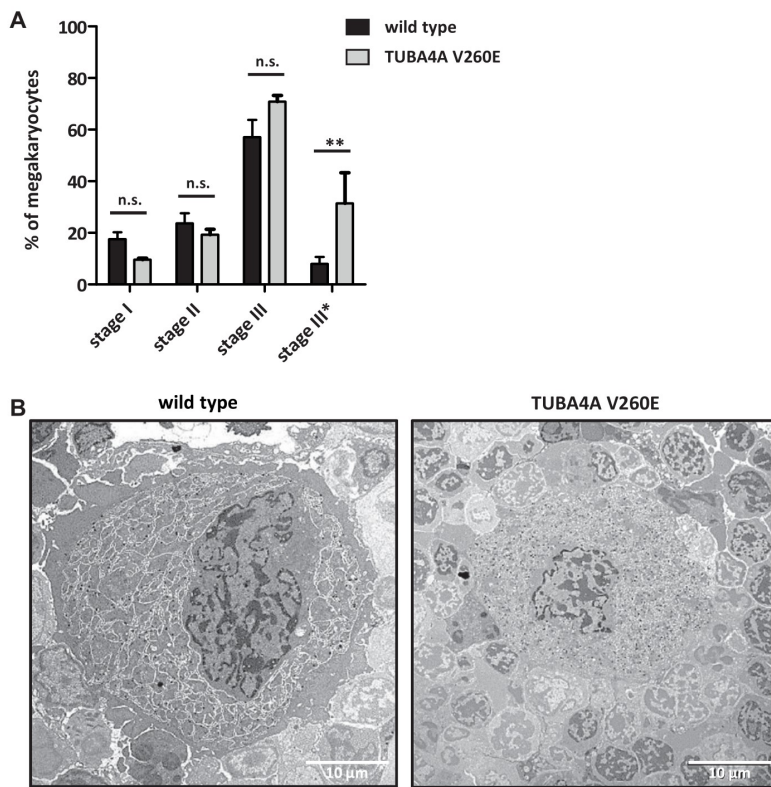


Figure 5. Abnormal ultrastructure of stage III bone marrow MKs in *Tuba4a*^{V260E/V260E} mice.

(A) Distribution of bone marrow MKs according to their stage of differentiation (I–III). MKs were staged in wild-type and *Tuba4a*^{V260E/V260E} mice according to morphological criteria (described in the Materials and Methods section) from transmission electron microscopy examination of bone marrow sections. Data expressed as the percentage of each stage correspond to 80 and 99 cells analyzed, respectively. Stage III* corresponds to MKs with an abnormal ultrastructure as represented in panel B. (***P* < 0.001; two-way ANOVA with Bonferroni posttest). **(B)** Representative transmission electron microscopy images of stage III MKs. A proportion of stage III MKs exhibited abnormal ultrastructural features in *Tuba4a*^{V260E/V260E} mice as compared with wild-type mice, characterized by a smaller size, a more condensed/compact demarcation membrane system, and lack of peripheral zone.

developed proplatelets, whereas this phenotype was observed in less than 10% of wild-type MKs. This confirmed the notion that in the absence of $\alpha 4A$ -tubulin, the early differentiation program of MKs is maintained, whereas the later stages of MK maturation and proplatelet formation are affected. The functional importance of $\alpha 4A$ -tubulin in later stages of MK maturation coincides with the increased expression of *TUBA4A* in these developmental stages (Fig 1B).

Discussion

Our knowledge of the distribution and function of tubulin isotypes is very rudimentary. In platelets, $\beta 1$ -tubulin was found to be the major β -tubulin isotype, and its expression was, for a long time, thought to be restricted to the MK lineage (11). Recently, *TUBB1* has also been detected in the thyroid, where it is important for the development of the thyroid gland (38). Studies of $\beta 1$ -tubulin-deficient mice, as well as the identification of patients carrying mutation in the *TUBB1* gene provided strong support for its functional importance in platelets (4, 5). In contrast, nothing was so far known about the role of specific α -tubulin isotypes, which are more difficult to quantify because of the extraordinary conservation of their peptide sequences. We overcame this obstacle by developing a quantitative mass spectrometry assay, revealing a

strong $\alpha 4A$ -tubulin enrichment in platelets. So far, *TUBA4A* had been found most abundantly only in the heart and muscle (27). Our data thus reveal a unique isotype composition of platelet tubulin, with high proportions of $\alpha 4A$ - and $\beta 1$ -tubulin that could account for the unique structural and dynamic properties of MTs in their marginal band. However, in contrast to $\beta 1$ -tubulin, which shows a strong sequence divergence from all other β -tubulin isotypes, the amino acid sequence of $\alpha 4A$ -tubulin is similar to most other α -tubulin isotypes. It is, thus, puzzling why its absence cannot be compensated by other α -tubulins.

There is, however, one unique feature distinguishing $\alpha 4A$ -tubulin from all other α -tubulin isotypes: it does not encode the ultimate C-terminal tyrosine residue. This implies that the prominent expression of $\alpha 4A$ -tubulin in platelets shifts the tubulin pool toward detyrosinated α -tubulin, which we indeed demonstrate in $\alpha 4A$ -tubulin-deficient platelets in both, the mutant mouse and the patient. Perturbing the tyrosination/detyrosination balance can have dramatic impacts: mice lacking tubulin tyrosine ligase show strong accumulation of detyrosinated α -tubulin and die postnatally. Neurons from these mice show uncontrolled and premature neurite outgrowth due to perturbed MT functions (39). Considering that the degree of tyrosination modulates bending flexibility of MTs in muscles (40), it is conceivable that the expression of *TUBA4A* regulates the bending of MTs during platelet formation.

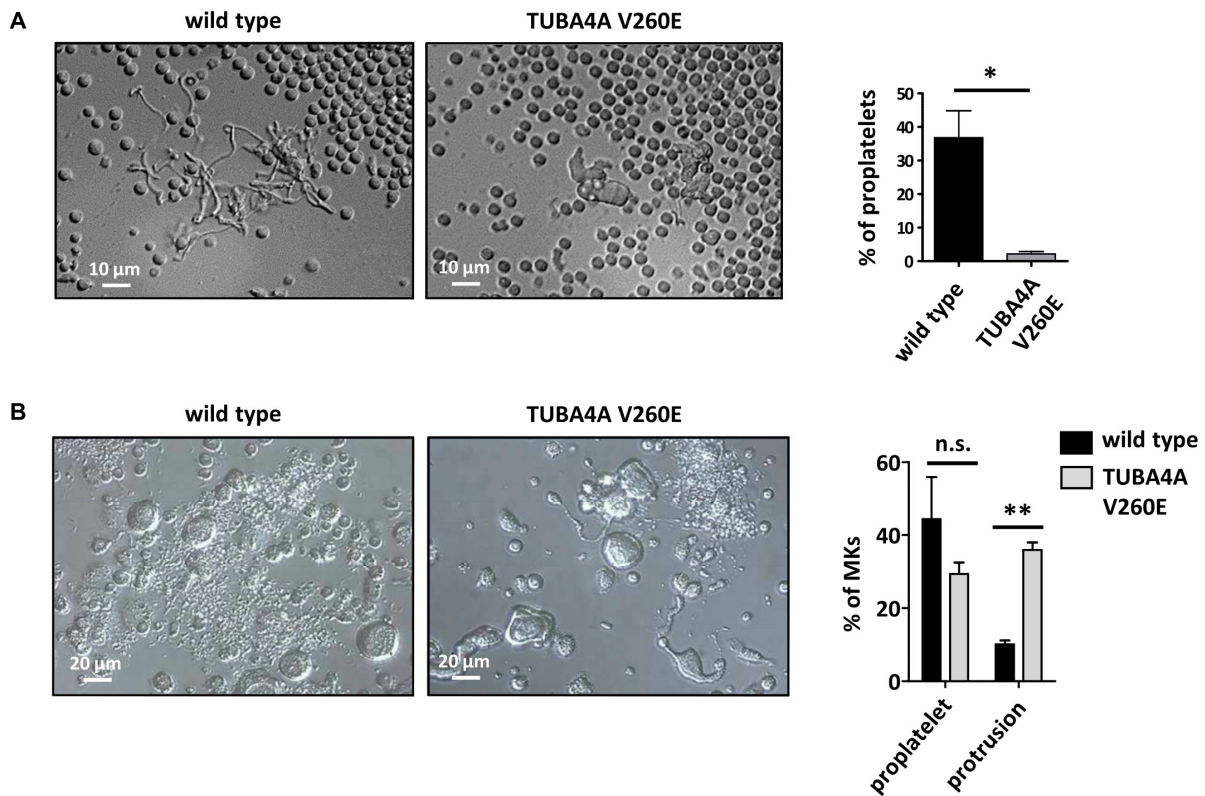


Figure 6. Impaired proplatelet formation in *Tuba4a*^{V260E/V260E} mice.

(A) Proplatelet extensions in bone marrow explants. (left) Representative DIC microscopy images of MKs observed at the edge of a bone marrow slice showing well-developed proplatelets in the wild-type and lack of pseudopodial extensions in *Tuba4a*^{V260E/V260E} mice. (right) The graph represents the percentage of MKs displaying proplatelets (wild type: 36.8 ± 8.1% and *Tuba4a*^{V260E/V260E}: 2.1 ± 0.7%; N = 494 and 495 MKs, respectively; *P = 0.0112, t test). **(B)** Proplatelet extensions of MKs cultured from *Lin*⁻ progenitors. (left) Representative DIC microscopy images of MKs cultured for 4 d from *Lin*⁻ progenitors showing MKs with abnormal shapes, displaying thick protrusions, in *Tuba4a*^{V260E/V260E} mice instead of well-developed proplatelets as seen in the WT. (right) The graph represents the percentage of MKs displaying proplatelets and thick protrusions (WT: 44.3 ± 11.5% and 10.1 ± 1.1%, respectively; *Tuba4a*^{V260E/V260E}: 29.3 ± 3.1% and 35.9 ± 2.1%, respectively; values from 213 WT and 162 *Tuba4a*^{V260E/V260E} MKs). (**P < 0.001; two-way ANOVA with Bonferroni posttest).

A comparison of *Tuba4a*^{V260E/V260E} and *Tubb1*-KO mice revealed striking similarities in platelet and MK defects. In both mouse models, platelets showed round morphology and decreased numbers of MT coils in marginal bands. The *TUBA4A* mutations in the patient also had a strong impact on platelet size and morphology but did not result in a lower number of MT coils. Similar observations were also made in several patients with *TUBB1* mutations (38), thus confirming the similarity of the defects caused by dysfunctions of these two tubulin isotypes. As mechanisms controlling the number of coils are still unknown, it is hard to predict how the absence or reduction of α 4A-tubulin could induce this phenotype.

The increased size of platelets in both *Tuba4a*^{V260E/V260E} (29.6% diameter increase) and *Tubb1*-KO (+30.4% diameter increase; Fig S1) suggests that both tubulin isotypes are essential to perform the mechanical task of bending the MTs sufficiently to obtain the correct platelet size and MT coil number. How α 4A- and β 1-tubulin participate in this process could be different: β 1-tubulin with its

highly divergent peptide sequence could directly change the biophysical parameters of the MT lattice. α 4A-tubulin, in contrast, is highly similar to other α -tubulin isotypes; thus, the lack of the C-terminal tyrosine might be essential for its function.

Mice and individuals defective in α 4A- (this study) and β 1-tubulin (4, 5) similarly exhibit decreased platelet counts of moderate severity, which varies depending on the particular mutation. They can range from 45% in adult *Tubb1*-KO mice (Fig S1B) to subnormal values in the patient reported here, and in some previously described patients carrying *TUBB1* mutations (38). Inefficient proplatelet formation as shown in cultured MK from *Tuba4a*^{V260E/V260E}, *Tubb1*-KO, and *TUBB1* patients could contribute to lower platelet release into the circulation. Surprisingly though, the platelet counts in blood are typically less affected as it could be expected from the important defects in proplatelets observed in cultured MKs. Indeed, discrepancies between effects observed in MK culture and in vivo have been documented for other mouse models with platelet defects (41). Although in vitro models might thus not fully

reproduce the *in vivo* situation, they can reveal subtle defects that are not easily detected as pathologies in the first place, but which can become damaging in longer terms, that is, in ageing, or in stress related to other pathologies. Altogether, similarities between mouse models and patients with β 1- and α 4A-tubulin deficiencies strongly indicate that both isotypes are essential for the correct formation of the marginal band during the final stages of MK maturation. This implies that the isotype composition of both, α - and β -tubulin pool, is essential for correct platelet biogenesis.

We thus showed that macrothrombocytopenia is a common salient feature of β 1-tubulin (4, 5) and α 4A-tubulin deficiencies. Hereditary macrothrombocytopenia represent a group of rare diseases for which a number of gene abnormalities have so far been identified, including genes encoding transcription factors, receptors and cytoskeletal proteins (42). However, genetic causes for defects in platelet numbers and size still remain uncharacterized for approximately 50% of the patients (43). Considering that this is the first report of a *TUBA4A* mutation in a single patient, these data will need independent validation from different patients to more firmly link the mouse model to the human pathology. To this end, genetic studies targeting this gene will be required to identify additional cases of hereditary macrothrombocytopenia of yet unknown origin caused by defects in *TUBA4*. How α 4A- and β 1-tubulin control the structure and biophysical properties of MTs in platelets remains to be determined. Considering that α 4A-tubulin affects the levels of tubulin deetyrosination, our findings underpin the importance of the tubulin code in the functional regulation of MTs and emphasize the key role of this code for proper platelet function.

Supplementary Information

Supplementary Information is available at <https://doi.org/10.26508/lsa.201900309>.

Acknowledgements

This work was supported by funds from the Association de Recherche et Développement en Médecine et Santé Publique (ARMESA to M Batzenschlager), has received support under the program Investissements d'Avenir launched by the French government and implemented by the French National Research Agency (ANR) with the references ANR-10-LBX-0038 and ANR-10-IDEX-0001-02 PSL, and was supported by a Program Grant (1113577) and Fellowship (1063008) from the Australian National Health and Medical Research Council and the DHB Foundation managed by ANZ Trustees. The work of C Janke was supported by the Institut Curie, ANR award ANR-12-BSV2-0007, and the Institut National du Cancer grants 2013-1-PL BIO-02-ICR-1 and 2014-PL BIO-11-ICR-1. We also thank the Proteomic French Infrastructure (ANR-10-INSB-08-03) for financial support. We thank Monique Freund for managing the animal facility at the EFS; Catherine Ziessel, Ketty Knez-Hippert, Jean-Yves Rinkel, Fabienne Proamer, and Véronique Heim for technical assistance; and Catherine Léon and Pierre Mangin for careful reading of the manuscript. We express our gratitude to Ramesh A Shivdasani for providing the *Tubb1* KO strain. We thank Valérie Proulle, Frédéric Adam, and Christelle Reperant for their help

in preparing platelets from the patient and to Aurore Desprès for the gene sequencing experiments.

Author Contributions

C Strassel: supervision, methodology, and writing—review and editing.
MM Magiera: investigation and methodology.
A Dupuis: investigation.
M Batzenschlager: investigation.
A Hovasse: investigation.
I Pleines: investigation.
P Guéguen: data curation, supervision, and investigation.
A Eckly: investigation and methodology.
S Moog: methodology.
L Mallo: methodology.
Q Kimmerlin: investigation.
S Chappaz: investigation.
J-M Strub: investigation.
N Kathiresan: investigation.
H de la Salle: data curation.
A Van Dorsseleer: supervision.
C Ferec: conceptualization and supervision.
J-Y Py: conceptualization.
C Gachet: supervision and writing—review and editing.
C Schaeffer-Reiss: conceptualization, supervision, and writing—review and editing.
BT Kile: conceptualization, supervision, and writing—review and editing.
C Janke: conceptualization, supervision, validation, and writing—original draft, review, and editing.
F Lanza: conceptualization, data curation, supervision, and writing—original draft.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Kenney DM, Linck RW (1985) The cytoskeleton of unstimulated blood platelets: Structure and composition of the isolated marginal microtubular band. *J Cell Sci* 78: 1–22.
2. White JG (1968) Effects of colchicine and Vinca alkaloids on human platelets. I. Influence on platelet microtubules and contractile function. *Am J Pathol* 53: 281–291.
3. White JG, Rao GHR (1998) Microtubule coils versus the surface membrane cytoskeleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape. *Am J Pathol* 152: 597–609.
4. Kunishima S, Kobayashi R, Itoh TJ, Hamaguchi M, Saito H (2009) Mutation of the beta1-tubulin gene associated with congenital macrothrombocytopenia affecting microtubule assembly. *Blood* 113: 458–461. doi:10.1182/blood-2008-06-162610
5. Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, Italiano JE Jr, Hartwig JH, Shivdasani RA (2001) A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr Biol* 11: 579–586. doi:10.1016/s0960-9822(01)00153-1

6. Italiano JE Jr, Bergmeier W, Tiwari S, Falet H, Hartwig JH, Hoffmeister KM, André P, Wagner DD, Shivdasani RA (2003) Mechanisms and implications of platelet discoid shape. *Blood* 101: 4789–4796. doi:10.1182/blood-2002-11-3491
7. Patel SR, Richardson JL, Schulze H, Kahle E, Galjart N, Drabek K, Shivdasani RA, Hartwig JH, Italiano JE Jr (2005) Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood* 106: 4076–4085. doi:10.1182/blood-2005-06-2204
8. Bender M, Thon JN, Ehrlicher AJ, Wu S, Mazutis L, Deschmann E, Sola-Visner M, Italiano JE, Hartwig JH (2015) Microtubule sliding drives proplatelet elongation and is dependent on cytoplasmic dynein. *Blood* 125: 860–868. doi:10.1182/blood-2014-09-600858
9. Ludueña R, Banerjee A (2008) The isotypes of tubulin: Distribution and functional significance. In *Cancer Drug Discovery and Development: The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology*, Fojo AT, Totowa, NJ (eds), 123–175. New York City, NY: Humana Press
10. Wang D, Villasante A, Lewis SA, Cowan NJ (1986) The mammalian beta-tubulin repertoire: Hematopoietic expression of a novel, heterologous beta-tubulin isotype. *J Cell Biol* 103: 1903–1910. doi:10.1083/jcb.103.5.1903
11. Lecine P, Italiano JE Jr, Kim SW, Villeval JL, Shivdasani RA (2000) Hematopoietic-specific beta 1 tubulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2. *Blood* 96: 1366–1373.
12. Burgoyne RD, Cambray-Deakin MA, Lewis SA, Sarkar S, Cowan NJ (1988) Differential distribution of beta-tubulin isotypes in cerebellum. *EMBO J* 7: 2311–2319. doi:10.1002/j.1460-2075.1988.tb03074.x
13. Joshi HC, Cleveland DW (1989) Differential utilization of beta-tubulin isotypes in differentiating neurites. *J Cell Biol* 109: 663–673. doi:10.1083/jcb.109.2.663
14. Jensen-Smith HC, Luduena RF, Hallworth R (2003) Requirement for the betaI and betaIV tubulin isotypes in mammalian cilia. *Cell Motil Cytoskeleton* 55: 213–220. doi:10.1002/cm.10122
15. Renthal R, Schneider BG, Miller MM, Ludueña RF (1993) Beta IV is the major beta-tubulin isotype in bovine cilia. *Cell Motil Cytoskeleton* 25: 19–29. doi:10.1002/cm.970250104
16. Portran D, Schaedel L, Xu Z, Thery M, Nachury MV (2017) Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. *Nat Cell Biol* 19: 391–398. doi:10.1038/ncb3481
17. Ti S-C, Alushin GM, Kapoor TM (2018) Human beta-tubulin isotypes can regulate microtubule protofilament number and stability. *Dev Cell* 47: 175–190 e175. doi:10.1016/j.devcel.2018.08.014
18. Magnin-Robert M, Spagnolo A, Alayi TD, Cilindre C, Mercier L, Schaeffer-Reiss C, Van Dorsselaer A, Clément C, Fontaine F (2014) Proteomic insights into changes in wood of *Vitis vinifera* L. in response to esca proper and apoplexy. *Phytopathol Mediterr* 53: 168–187.
19. Sloves PJ, Delhaye S, Mouveaux T, Werkmeister E, Slomianny C, Hovasse A, Dilezitoko Alayi T, Callebaut I, Gaji RY, Schaeffer-Reiss C, et al (2012) Toxoplasma sortilin-like receptor regulates protein transport and is essential for apical secretory organelle biogenesis and host infection. *Cell Host Microbe* 11: 515–527. doi:10.1016/j.chom.2012.03.006
20. Strassel C, Brouard N, Mallo L, Receveur N, Mangin P, Eckly A, Bieche I, Tarte K, Gachet C, Lanza F (2016) Aryl hydrocarbon receptor-dependent enrichment of a megakaryocytic precursor with a high potential to produce proplatelets. *Blood* 127: 2231–2240. doi:10.1182/blood-2015-09-670208
21. Strassel C, Eckly A, Leon C, Moog S, Cazenave JP, Gachet C, Lanza F (2012) Hirudin and heparin enable efficient megakaryocyte differentiation of mouse bone marrow progenitors. *Exp Cell Res* 318: 25–32. doi:10.1016/j.yexcr.2011.10.003
22. Eckly A, Strassel C, Cazenave JP, Lanza F, Leon C, Gachet C (2012) Characterization of megakaryocyte development in the native bone marrow environment. *Methods Mol Biol* 788: 175–192. doi:10.1007/978-1-61779-307-3_13
23. Cazenave JP, Ohlmann P, Cassel D, Eckly A, Hechler B, Gachet C (2004) Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol Biol* 272: 13–28. doi:10.1385/1-59259-782-3:013
24. Magiera MM, Janke C (2013) Investigating tubulin posttranslational modifications with specific antibodies. *Methods Cell Biol* 115: 247–267. doi:10.1016/b978-0-12-407757-7.00016-5
25. Adessi C, Miege C, Albrieux C, Rabilloud T (1997) Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins: A current challenge for immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 18: 127–135. doi:10.1002/elps.1150180124
26. Carapito C, Aebersold R (2012) Targeted proteomics. *Proteomics* 12: 1073. doi:10.1002/pmic.201270035
27. Villasante A, Wang D, Dobner P, Dolph P, Lewis SA, Cowan NJ (1986) Six mouse alpha-tubulin mRNAs encode five distinct isotypes: Testis-specific expression of two sister genes. *Mol Cell Biol* 6: 2409–2419. doi:10.1128/mcb.6.7.2409
28. Troussard X, Vol S, Cornet E, Bardet V, Couaillac JP, Fossat C, Luce JC, Maldonado E, Siguret V, Tichet J, et al (2014) Groupe francophone d'hématologie cellulaire (GFHC). [Determination of full blood count normal reference values for adults in France]. *Ann Biol Clin (Paris)* 72: 561–581. doi:10.1684/abc.2014.0979
29. Breitling F, Little M (1986) Carboxy-terminal regions on the surface of tubulin and microtubules. Epitope locations of YOL1/34, DM1A and DM1B. *J Mol Biol* 189: 367–370. doi:10.1016/0022-2836(86)90517-6
30. Cleveland DW, Pittenger MF, Feramisco JR (1983) Elevation of tubulin levels by microinjection suppresses new tubulin synthesis. *Nature* 305: 738–740. doi:10.1038/305738a0
31. Pachter JS, Yen TJ, Cleveland DW (1987) Autoregulation of tubulin expression is achieved through specific degradation of polysomal tubulin mRNAs. *Cell* 51: 283–292. doi:10.1016/0092-8674(87)90155-3
32. Wang Y, Tian G, Cowan NJ, Cabral F (2006) Mutations affecting beta-tubulin folding and degradation. *J Biol Chem* 281: 13628–13635. doi:10.1074/jbc.m513730200
33. Janke C (2014) The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, and functions. *J Cell Biol* 206: 461–472. doi:10.1083/jcb.201406055
34. Patel-Hett S, Richardson JL, Schulze H, Drabek K, Isaac NA, Hoffmeister K, Shivdasani RA, Bulinski JC, Galjart N, Hartwig JH, et al (2008) Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules. *Blood* 111: 4605–4616. doi:10.1182/blood-2007-10-118844
35. Sadoul K, Wang J, Diagouraga B, Vitte AL, Buchou T, Rossini T, Polack B, Xi X, Matthias P, Khochbin S (2012) HDAC6 controls the kinetics of platelet activation. *Blood* 120: 4215–4218. doi:10.1182/blood-2012-05-428011
36. Iancu-Rubin C, Gajzer D, Mosoyan G, Feller F, Mascarenhas J, Hoffman R (2012) Panobinostat (LBH589)-induced acetylation of tubulin impairs megakaryocyte maturation and platelet formation. *Exp Hematol* 40: 564–574. doi:10.1016/j.exphem.2012.02.004
37. Messaoudi K, Ali A, Ishaq R, Palazzo A, Sliwa D, Bluteau O, Souquère S, Muller D, Diop KM, Rameau P, et al (2017) Critical role of the HDAC6-cortactin axis in human megakaryocyte maturation leading to a proplatelet-formation defect. *Nat Commun* 8: 1786. doi:10.1038/s41467-017-01690-2
38. Stoupa A, Adam F, Kariyawasam D, Strassel C, Gawade S, Szinnai G, Kauskot A, Lasne D, Janke C, Natarajan K, et al (2018) TUBB1 mutations cause thyroid dysgenesis associated with abnormal platelet physiology. *EMBO Mol Med* e9569. doi:10.15252/emmm.201809569

39. Erck C, Peris L, Andrieux A, Meissirel C, Gruber AD, Vernet M, Schweitzer A, Saoudi Y, Pointu H, Bosc C, et al (2005) A vital role of tubulin-tyrosinase for neuronal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 7853–7858. doi:[10.1073/pnas.0409626102](https://doi.org/10.1073/pnas.0409626102)
40. Robison P, Caporizzo M, Ahmadzadeh H, Bogush AI, Chen CY, Margulies KB, Shenoy VB, Prosser BL (2016) Detyrosinated microtubules buckle and bear load in contracting cardiomyocytes. *Science* 352: aaf0659. doi:[10.1126/science.aaf0659](https://doi.org/10.1126/science.aaf0659)
41. Eckly A, Strassel C, Freund M, Cazenave JP, Lanza F, Gachet C, Léon C (2009) Abnormal megakaryocyte morphology and proplatelet formation in mice with megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation. *Blood* 113: 3182–3189. doi:[10.1182/blood-2008-06-164061](https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-164061)
42. Savoia A (2016) Molecular basis of inherited thrombocytopenias: An update. *Curr Opin Hematol* 23: 486–492. doi:[10.1097/moh.0000000000000269](https://doi.org/10.1097/moh.0000000000000269)
43. Balduini CL, Melazzini F, Pecci A (2017) Inherited thrombocytopenias—recent advances in clinical and molecular aspects. *Platelets* 28: 3–13. doi:[10.3109/09537104.2016.1171835](https://doi.org/10.3109/09537104.2016.1171835)



License: This article is available under a Creative Commons License (Attribution 4.0 International, as described at <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplemental Experimental Procedures:

Mice: The protocols carried out in this study were in accordance and approved by the CREMEAS Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Strasbourg (Comité Régional d’Ethique en Matière d’Expérimentation Animale Strasbourg). Permit Number 2016-121 414 599 992.

Purification of tubulin from human platelets: Platelets were isolated from fresh ACD-anticoagulated blood, and washed once in PEM buffer (100 mM Pipes, 10 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, pH 6.9) supplemented with 1 nM PGI₂. Following centrifugation the platelet pellet was resuspended in cold PEM containing 2 mM GTP and lysed by sonication on ice. Repeated cycles of depolymerization at 0°C and polymerization at 37°C in the presence of 4 M glycerol and 1 mM GTP were then performed, with separation of the polymerized form by ultracentrifugation at 37°C. Care was taken to eliminate actin, which is the main contaminant in these procedures. Following two cycles of depolymerization-polymerization we usually obtained a minimum of 150 µg of tubulin with >90% purity from a 400-mL blood donation.

Platelet washing procedure: Platelets were washed according to Cazenave et al.²⁴.

RT-PCR amplification of tubulin transcripts in cultured MKs : RNA was extracted from CD34⁺ cells (day 0) and at different time points of culture (days 4, 7, 10 and 12) using an RNeasy[®] Mini kit (QIAGEN) following manufacturer's instructions. RNA was subjected to RT-PCR with primers specific for TUBA1, TUBA4A, TUBA8, and TUBB1 (primer sequences in Table S1). Amplified bands (30 cycles, extension at 57°C) were separated by agarose gel electrophoresis and their intensity was measured using GelDoc EZ System. Expression levels were normalized to that of 18S.

LC-MS/MS analysis of platelet tubulin: Tryptic peptides were analyzed on a nanoACQUITY Ultra-Performance-LC system (UPLC, Waters, Milford, USA) coupled to a Q-TOF mass spectrometer (maXis 4G, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a nano electrospray source operating in positive mode. The UPLC system was equipped with a Symmetry C18 precolumn (20×0.18 mm, 5 µm particle size) and an ACQUITY UPLC[®] BEH130 C18 separation column (75 µm×250 mm, 1.7 µm particle size, Waters). Raw data collected during nanoLC-MS/MS analyses were processed, and then converted into mgf files with DataAnalysis (BrukerDaltonics, Bremen Germany). The MS/MS data were analyzed using the MASCOT 2.4.1 algorithm (Matrix Science, London, UK) and results were loaded into the Scaffold software (version 3.6.5, Proteome Software Inc., Portland, USA) and filtered in order to set the false discovery rate to less than 1%.

LC-SRM analyses of platelet α -tubulin isotypes: High-purity isotopically labelled equivalent peptides were purchased (AQUA peptides, Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany). For the SRM analyses, samples were submitted to a tube-gel sample preparation⁴⁵. The gel pieces were reduced, alkylated and trypsin digested. The mixture of the heavilylabelled peptides and iRT peptides (Biognosys) were added to each sample prior to SRM analyses. LC-SRM analyses were performed on a Thermo TSQ Vantage (Thermo Scientific) coupled to a Dionex Ultimate 3000 MicroLC. The complete system was fully controlled by Xcalibur 2.1 (Thermo Scientific). Three to four transitions were monitored for both endogenous and heavy labeled peptides. Mass data collected during LC-SRM were processed with the Skyline open-source software⁴⁶. Area intensity ratios of the heavy and the light forms of each peptide were manually checked. The concentration for target peptides of α 4A- and α 8-tubulins were normalized to the total α -tubulin content.

Western blotting: PVDF membranes were incubated with specific primary antibodies. The primary antibodies used were: monoclonal anti- α -tubulin (clone DM1a; Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) (1/1500), polyclonal anti- α 4A-tubulin (pAb 7621) (1/250), anti tyrosinated α -tubulin (clone 1.A2, Sigma) (1/1000), and monoclonal anti-deTyr α -tubulin (clone 1D5) (0.4 μ g/mL). Membranes were incubated with 50 ng/mL peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or goat anti-mouse IgG (Jackson Immuno Research, PA, USA) and 50 ng/mL goat anti GAPDH peroxidase conjugated (Abcam, Paris, France) resolved by Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Immunofluorescence microscopy: Platelets fixed and captured on poly-Lysine slides were permeabilized for 5 min with 0.1% Triton X-100 in PBS and incubated sequentially for 30 min with 1 μ g/mL α -tubulin mAb (clone DM1a, Sigma Aldrich) or tyrosinated α -tubulin mAb used at a 1/800 dilution (clone TUB.1A2, Sigma Aldrich) and 1 μ g/mL GAM-Alexa 488 (Life Technologies, USA) in PBS containing 1% BSA. The platelets were washed thoroughly at each step with PBS. The slides were mounted in Mowiol (Mountant, Permafluor, Thermo Fisher Scientific, UK).

Transmission electron microscopy: MKs and washed platelets embedded in Epon were classically processed. The procedure we used to prepare the washed platelets was as described in Cazenave et al.²⁴, and is well-established to preserve the platelets in their resting state. Transversal thin sections of the entire BM were cut, contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined under a CM120 TEM (FEI, Eindhoven, The Netherlands)⁴⁷. MKs at stages

I, II and III were counted manually on whole transversal sections as previously described⁴. To facilitate quantification, each square of the grids is defined as an area for examination (which equals 16,000 μm^2). The number of MTs was counted in individual platelets (n= 30-50 platelets) that were sectioned transversally and where they appear as a cluster of small circles.

Scanning electron microscopy: Platelets in suspension were fixed with 2.5% glutaraldehyde and allowed to adhere to poly-L-lysine-coated coverslips. Samples were dehydrated, air-dried, sputtered with platinum palladium, and examined at 10 kV under a PHENOM scanning electron microscope (PHENOM World, Eindhoven, The Netherlands).

MK culture:

- **Mouse:** Bone marrow cells were flushed from the femurs and tibias and passed successively through 21-, 23- and 25-gauge needles. Cells were then pelleted at 1,200 rpm for 7 min and resuspended at 1×10^8 cells/mL in PBS supplemented with 5% (v/v) rat serum and 2 mM EDTA to perform a Lin selection (Stem Cell Technologies). The Lin⁻ population was adjusted to 5×10^6 cells/mL in DMEM containing 2 mM L-glutamine, penicillin/streptomycin, 10% FBS and 50 ng/ml TPO with addition of 50 U/mL hirudin. Cultures were usually performed in 12-well tissue culture plates with 700 μl of cell suspension per well and incubated at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere for up to 5 days.

- **Human:** CD34⁺ cells seeded at 4×10^4 per mL were cultured in StemSpan SFEM medium supplemented with 20 ng/mL human LDL, CC220 (1X), and 1 μM StemRegenin-1 (SR1). On day 7, the cells in suspension were harvested, washed and cultured at 5×10^4 /mL in StemSpan SFEM medium containing 50 ng/mL TPO for an additional 7 days. The percentage of MKs extending proplatelets was determined in the culture wells by phase-contrast microscopy. In each culture, at least 600 MKs were analyzed and images were acquired using a Zeiss Axio Vert.A1 microscope with a 20 \times objective (Marly le Roi, France).

Screening and gene sequencing of blood donors: DNA was extracted from buccal swabs using Maxwell 16 Blood Purification kit, amplified using AmpliSeq™ Library Kit 2.0 kit (ThermoFisher), and primers were digested with FuPa Reagent included in the kit. A barcode unique for each DNA was added to each library using the Ion Xpress™ Barcode Adapters kit (ThermoFisher) and library purification was performed using Agencourt® AMPure® XP Reagent magnetic beads (Beckman Coulter). Libraries were processed using Ion IC HiQ PI, kit (ThermoFisher) for sequencing on Ion Proton (ThermoFisher). Data was processed using

Torrent Suite Software v5.2.1 and variants were annotated using SeqNext v4.0.1 (JSI) and also VCF files from the Torrent server (Variant caller 5.2). Variants were examined for their frequency in the normal population using the ExAC database.

Supplemental Figures:

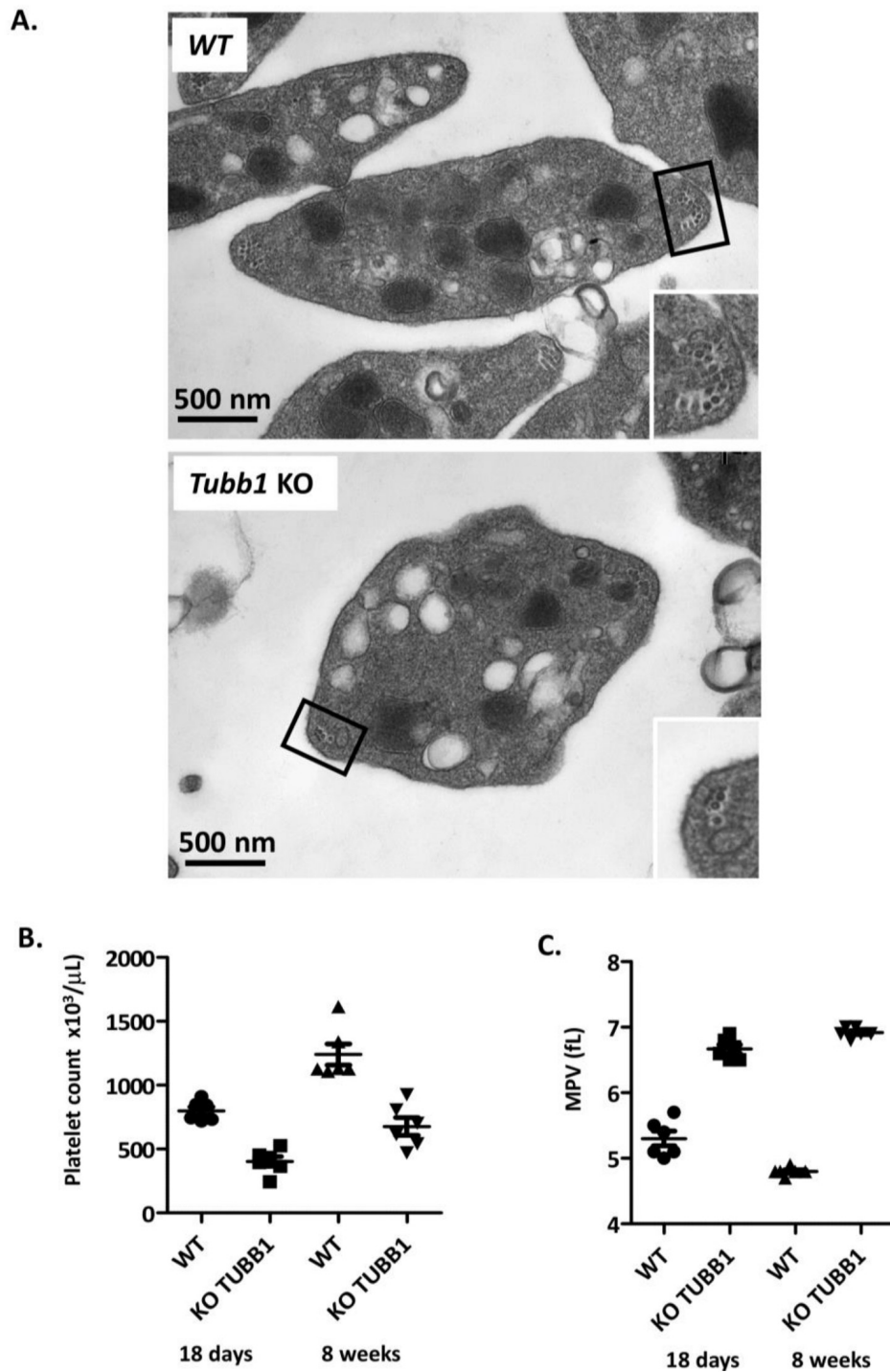
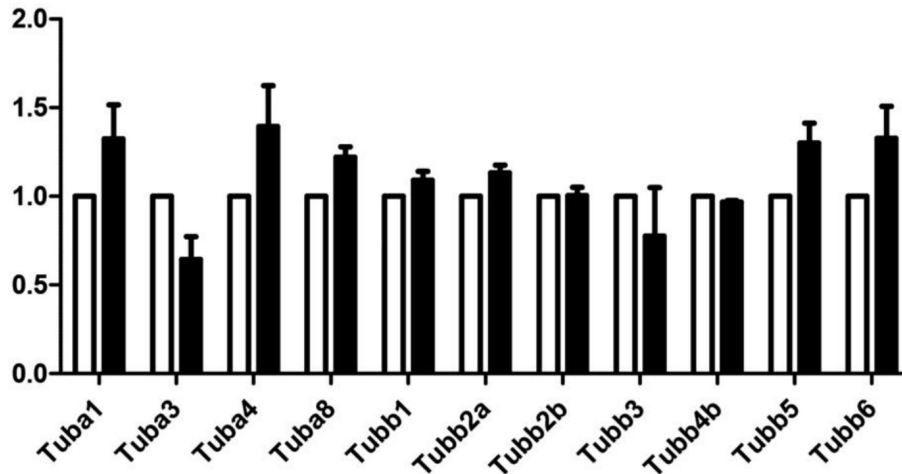


Figure S1: Ultrastructure, platelet counts and mean platelet volume in *Tubb1* KO mice. (A). Representative transmission electron microscopy images of WT and β 1-tubulin deficient platelet suspensions. (B-C) Platelet counts and mean platelet volume of WT and *Tubb1* KO mice of 18 days or 8 weeks of age.

A.



B.

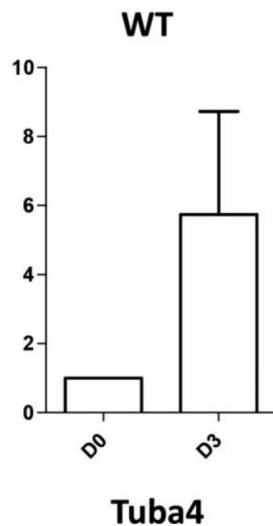
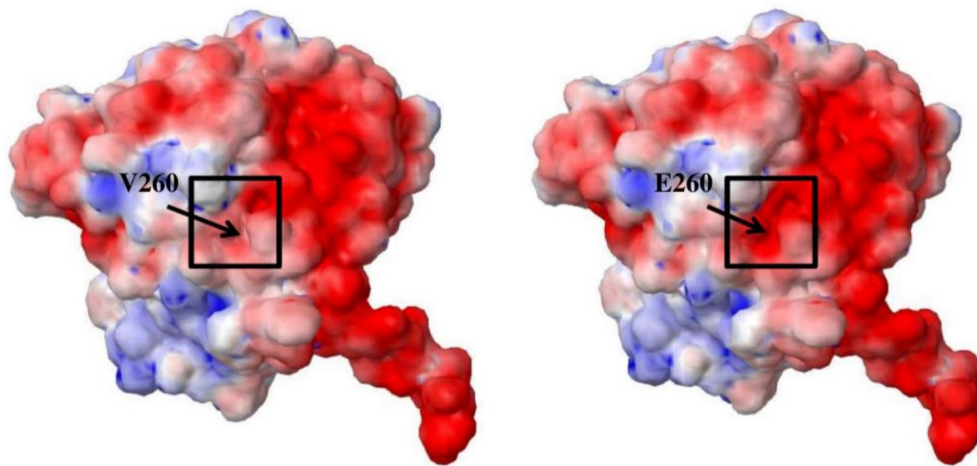


Figure S2: qRT-PCR analysis of tubulin transcripts in wild type and Tuba4aV260E/V260E megakaryocytes. (A) qRT-PCR analysis of transcripts for Tuba and Tubb transcripts in WT (white bars) and Tuba4aV260E (black bars) megakaryocytes cultured from bone marrow Lin⁻ cells. Mean values from three separate cultures. Values were normalized using Tbp (TATA Binding Protein) as a reference using the $\Delta\Delta\text{ct}$ method. (B) qRT-PCR analysis of Tuba4 transcripts in WT Lin⁻ cells (D0) and differentiated megakaryocytes (D3). Mean values from three separate cultures. Values were normalized using Tbp (TATA Binding Protein) as a reference using the $\Delta\Delta\text{ct}$ method.

A.



B.

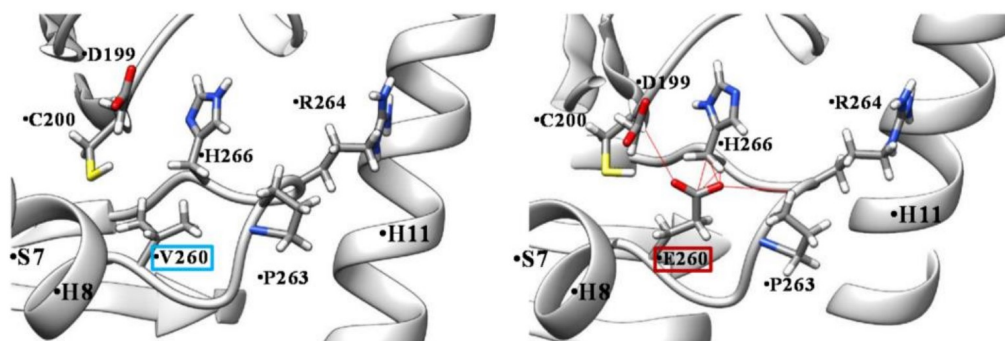


Figure S3: 3-D modelling of the V260E mutation in α 4A tubulin. (A) Electrostatic analysis. (left) TUBA4A wild type (right) V260E mutation. (B) Molecular modelling. (right) V260E mutant interactions. The red lines show the pseudo bonds created due to steric clashes of E260 residues with the neighboring residues around the mutated site.

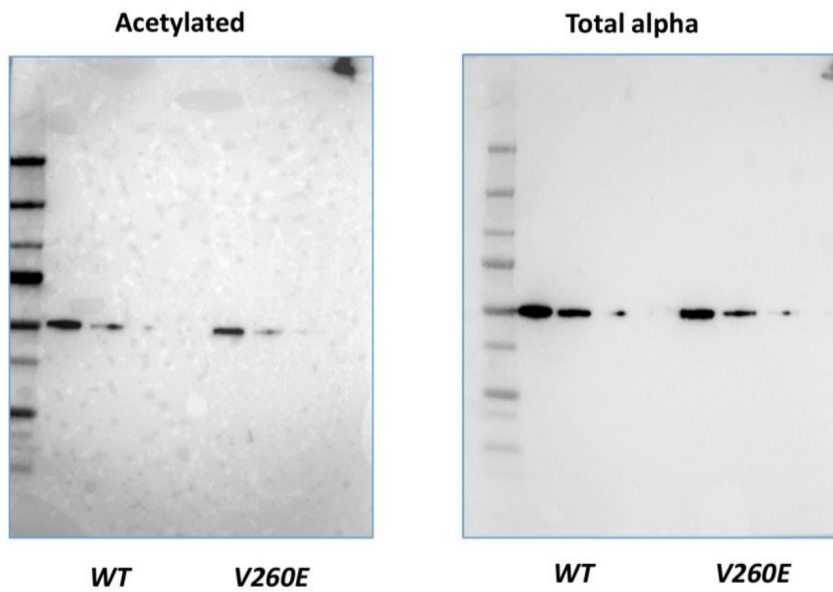


Figure S4: Serial dilutions of platelet lysates from WT and Tuba4aV260E/V260E mice were separated by SDS-PAGE, probed with the antibody against acetylated α -tubulin (6-11B-1) (left panel) or DM1a recognizing all the α -tubulin isoforms (right panel) and revealed with GAM-HRP.

Supplemental References:

45. Muller L, Fornecker L, Van Dorsselaer A, Cianferani S, Carapito C. Benchmarking sample preparation/digestion protocols reveals tube-gel being a fast and repeatable method for quantitative proteomics. *Proteomics*. 2016; 16(23): 2953–2961.
46. MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics*. 2010;26(7):966-968.
47. Eckly A, Strassel C, Cazenave JP, Lanza F, Leon C, Gachet C. Characterization of megakaryocyte development in the native bone marrow environment. *Methods Mol Biol*. 2012;788:175-192.

Annexe 2

*Article: The tubulin code
in platelet biogenesis*



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Seminars in Cell and Developmental Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/semcdb

The tubulin code in platelet biogenesis.

Quentin Kimmerlin, Catherine Strassel, Anita Eckly, François Lanza*

Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand-Est, BPPS UMR-S1255, FMTS, Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Megakaryocyte
Platelet
Marginal band
Microtubule
Tubulin code

ABSTRACT

Blood platelets are small non-nucleated cellular fragments that prevent and stop hemorrhages. They are produced in the bone marrow by megakaryocytes through megakaryopoiesis. This intricate process involves profound microtubule rearrangements culminating in the formation of a unique circular sub-membranous microtubule array, the marginal band, which supports the typical disc-shaped morphology of platelets. Mechanistically, these processes are thought to be controlled by a specific tubulin code. In this review, we summarize the current knowledge on the key isotypes, notably β 1-, α 4A- and α 8-tubulin, and putative post-translational modifications, involved in platelet and marginal band formation. Additionally, we provide a provisional list of microtubule-associated proteins (MAPs) involved in these processes and a survey of tubulin variants identified in patients presenting defective platelet production. A comprehensive characterization of the platelet tubulin code and the identification of essential MAPs may be expected in the near future to shed new light on a very specialized microtubule assembly process with applications in platelet diseases and transfusion.

1. Introduction

Blood platelets are small non-nucleated cellular fragments that prevent and stop hemorrhages [1]. In mammals, they are produced in the bone marrow by large polyploid cells known as megakaryocytes, which differentiate from hematopoietic stem cells through megakaryopoiesis (Fig. 1A). This complex process, which is very much alike in mice and humans, comprises multiple cycles of endomitosis which occur through successive rounds of failed cytokinesis and result in highly polyploid cells with a single polylobulated nucleus [2]. Megakaryopoiesis is accompanied by the development of specialized granules essential for platelet functions [3] and by the formation of an elaborate intracellular membrane network called the demarcation membrane system, initiated by invagination of the plasma membrane [4]. The demarcation membrane system constitutes a membrane reservoir for the extension of cytoplasmic protrusions, termed proplatelets, which penetrate the endothelial barrier of the bone marrow sinusoids to release newly formed platelets in the circulation [5] (Fig. 1B). In the very last stages of this process, a circular microtubule scaffold, called the marginal band, is assembled under the platelet membrane [6] (Fig. 1C). This remarkable structure enables platelets to adopt their typical flat disc-shaped morphology which contrasts strongly with that of other blood cells. The marginal band is unique to blood platelets in mammals and like

platelet biogenesis, is believed to be under the control of a particular combination of tubulin isotypes and post-translational modifications, known as the tubulin code. The present review will summarize the current knowledge on the role of microtubules in platelet biogenesis and marginal band formation in mice and man. It will focus on the latest, but still incomplete, information on the platelet tubulin code and certain effectors, the microtubule-associated proteins (MAPs), which could be involved in these processes. It will finally refer to the known tubulinopathies affecting the platelet lineage in man.

2. Microtubule organization and functions in the platelet lineage

2.1. Microtubules in megakaryocytes

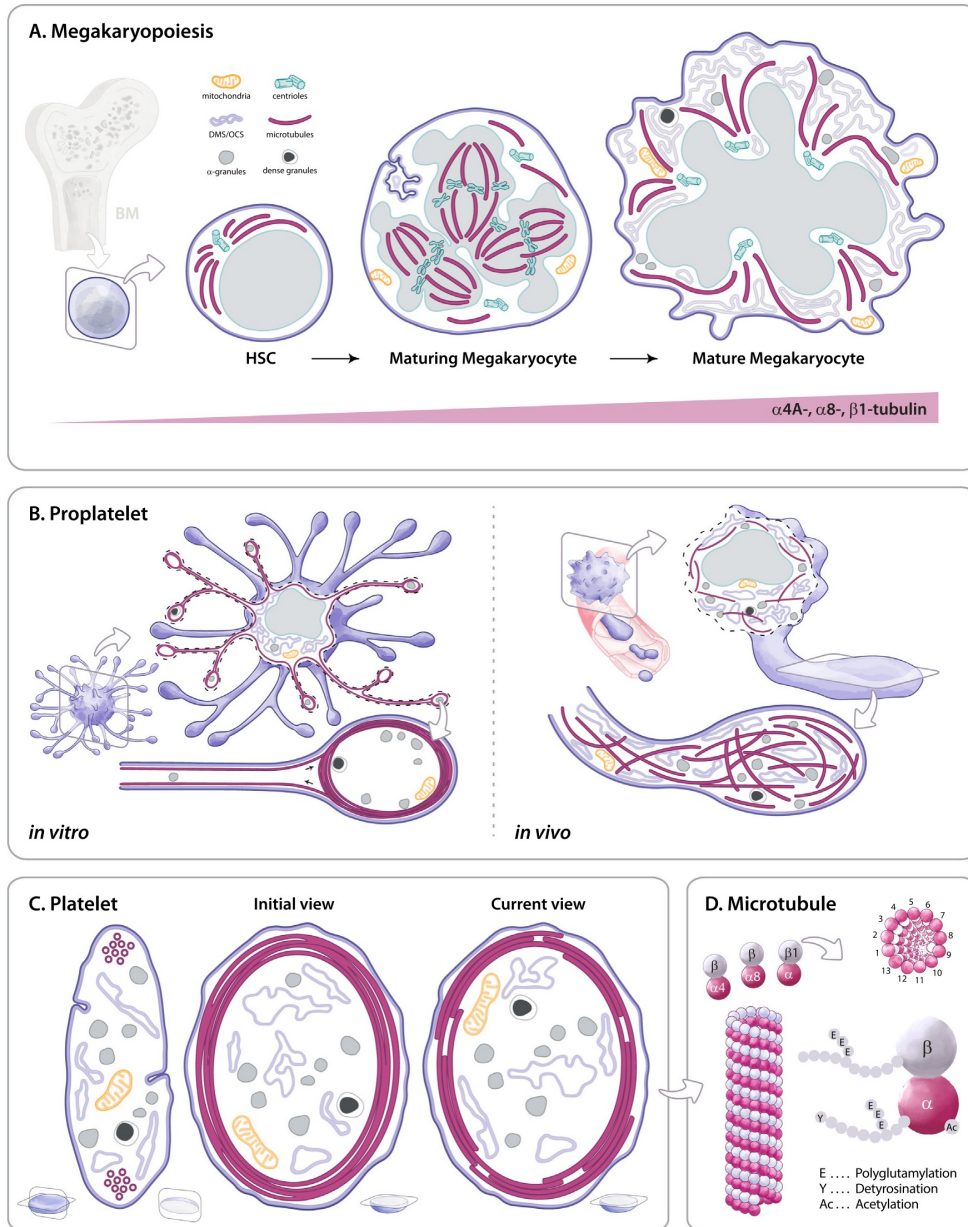
Microtubules were observed in megakaryocytes more than fifty years ago [7]. However, a thorough study of the processes leading to platelet biogenesis is somewhat recent in comparison with other blood lineages. This progress stemmed from the identification and cloning of thrombopoietin [8], the major cytokine governing megakaryopoiesis. Its discovery opened the way to efficiently reproduce this elaborate process *in vitro* [9]. The importance of the microtubule cytoskeleton in platelet formation has therefore been deduced mainly through the use of rodent

* Corresponding author.

E-mail addresses: Quentin.kimmerlin@efs.sante.fr (Q. Kimmerlin), Catherine.strassel@efs.sante.fr (C. Strassel), Anita.michel@efs.sante.fr (A. Eckly), Francois.Lanza@efs.sante.fr (F. Lanza).<https://doi.org/10.1016/j.semcd.2022.01.010>

Received 18 May 2021; Received in revised form 12 January 2022; Accepted 31 January 2022

1084-9521/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.



(caption on next page)

Fig. 1. : Microtubules in platelet biogenesis, (A) Megakaryocyte differentiation. Bone marrow hematopoietic stem cells (HSCs) undergo profound microtubule rearrangements throughout megakaryopoiesis. The microtubule cytoskeleton participates in the polyploidization of differentiating megakaryocytes, which proceeds through multiple cycles of endomitosis, leading to a single polylobulated nucleus. This is accompanied by the development of specialized granules (α - and dense) and the demarcation membrane system (DMS), initiated by invagination of the plasma membrane. Mature megakaryocytes extend microtubules from the centrosomes through the cytoplasm which radiate towards the cell periphery. The repertoire of tubulin isotypes evolves during the whole process, with an increase in α 4A-, α 8- and β 1-tubulin. The evolution of tubulin post-translational modifications in megakaryopoiesis is currently unknown, (B) Proplatelet formation. (Left) *In vitro*-based model. Microtubules organize into bundles underneath the plasma membrane of the megakaryocyte and penetrate the nascent proplatelets, which typically appear as numerous thin, branched cytoplasmic extensions with a bulbous end. Proplatelet elongation is propelled by a dynein-dependent microtubule sliding mechanism. The microtubules loop at the bulbous end, creating a structure highly reminiscent of the platelet marginal band (*vide infra*). Intracellular granules and mitochondria are transported along the microtubule bundles and retained at the tip. These *in vitro* observations led to a model where platelets are manufactured and released from the distal part of proplatelets. (Right) *In vivo*-based model. Bone marrow megakaryocytes typically extend a single, larger cytoplasmic extension into the blood vessel. The microtubules appear disorganized in these *in vivo* proplatelets and are not arranged into bundles. In this model, proplatelets are released as a whole into the blood, where they subsequently fragment in the microcirculation and remodel into *bona fide* platelets with their characteristic marginal band, (C) Platelets. In platelets, the microtubule cytoskeleton forms a unique structure, the marginal band, which encircles their sub-membranous space and supports their disc-shaped morphology. In a transversal view (left), the marginal band appears as a cluster of 8–12 microtubules located at the platelet's two extremities. Early equatorial views obtained by transmission electron microscopy (middle) led to an initial model where the marginal band was composed of a single non-interrupted microtubule. More recent imaging studies favor a current model where it consists of multiple shorter microtubules bundled together by yet unknown mechanisms (right). The cytoplasm contains α - and dense granules and an open canalicular system (OCS) arising from membrane invaginations, (D) Platelet microtubules. Platelet microtubules are composed of α/β tubulin heterodimers assembled into 13 protofilaments. α 4A-, α 8- and β 1-tubulin isotypes have been shown to be essential for platelet biogenesis in studies in mice and patients. Tubulin acetylation, tyrosination, glutamylation and glycylation have also been detected, but their relative levels are currently unknown.

cultured megakaryocytes (much more easily accessible than their human counterparts) and anti-tubulin drugs. Microtubule depolymerizing agents were notably found to dramatically impair megakaryocyte maturation and proplatelet formation. In particular, colchicine and nocodazole inhibited proplatelet formation in cultured megakaryocytes from the rat and guinea pig, respectively [10,11]. Vincristine, injected into rats, led to decreased platelet counts and an abnormal megakaryocyte ultrastructure highly reminiscent of failed proplatelet formation [12]. This agent was recently shown by two-photon intravital microscopy in mouse bone marrow to induce proplatelet shrinkage through combined disassembly of the microtubule scaffold and actomyosin-triggered contraction [13]. Taken together, these studies demonstrated that microtubules are crucial for platelet biogenesis, particularly at the proplatelet stage.

Early studies of mouse cultured megakaryocytes aimed at precisely characterizing the behavior and functions of the microtubule cytoskeleton in the final stages of platelet biogenesis. Observation of the most mature cultured megakaryocytes revealed that the microtubules switch to an acentrosomal mode of nucleation shortly before proplatelet formation, and concomitantly relocate to the cell cortex. There, the newly-assembled microtubules arrange into bundles which follow the membrane and penetrate the nascent proplatelets [14]. These bundles were later found to propel proplatelet elongation in mouse cultured megakaryocytes, through a dynein-dependent microtubule sliding mechanism [14,15]. Interestingly, this process causes the microtubules to loop and coil at the distal end of the proplatelet, forming a marginal band-like structure [16]. The latter *in vitro* observation, also observed in human cultured megakaryocytes [17], led to a model where platelets are manufactured and continuously released into the blood from the very end of proplatelets (Fig. 1B). However, this model may not exactly apply *in vivo*, as has been revealed in intravital microscopy studies conducted in mice, which allow one to visualize megakaryocytes and proplatelets directly inside the bone marrow. It was notably observed that the microtubules are not bundled in mouse proplatelets generated *in vivo*, but are rather individually and heterogeneously distributed [13,18] (Fig. 1B). Furthermore, it was found that *in vivo* proplatelets do not directly liberate platelets from their extremities, but are instead released as a whole into the vasculature, where they later fragment into platelets in the downstream pulmonary microcirculation [13,19,20]. Thus, both *in vitro* and *in vivo* data have revealed the importance of microtubules in platelet biogenesis, but the exact mechanisms and molecular pathways involved in this very specialized process still remain to be fully elucidated.

2.2. Microtubules in platelets

As they are easy to isolate from the blood, platelets were subjected very early to electron microscopy analyses. Glutaraldehyde-based fixation methods helped, more than half a century ago [21], to identify a remarkable microtubule scaffold in platelets, called the marginal band, which encircles their sub-membranous space and supports their disc-shaped morphology [6,22] (Fig. 1C). This structure is unique to blood platelets in mammals, with an architecture that remains extremely well-conserved between rodents and man. In terms of composition, the marginal band comprises up to 60% of the total platelet tubulin content in man [23]. It was initially thought to be formed by a single non-interrupted microtubule looping 10–15 times beneath the membrane, as one or two free microtubule ends were frequently observed by electron microscopy [24,25] (Fig. 1C). This concept has since been refuted on the grounds of microscopy analyses of GFP-EB3-expressing or γ -tubulin-labeled platelets, which showed that the platelet marginal band contains at least 7–12 independent, dynamic and acentrosomal microtubules [26] (Fig. 1C). More recently, the use of high resolution electron tomography technique coupled to super-resolution microscopy, revised this number upwards with an average of 24 microtubules of mixed polarities [27].

Microtubules are rigid polymers, with a persistence length estimated at around 5.2 μ m, clearly exceeding the normal diameter of human and mouse platelets [28]. Platelet microtubules are therefore able to withstand substantial physical constraints, which raises the question of the contributing factors. Interestingly, the integrity of this microtubule structure can be preserved after platelet lysis under non-fixating conditions [24,25,29]. This suggests that the marginal band is not solely the result of tight spatial constraints, but that yet unknown associated factors actively participate in its formation and maintenance [29]. Furthermore, marginal bands isolated in the presence of taxol and Triton-X100 progressively uncoil in response to increasing concentrations of NaCl and trypsin, but not of DNase I [30]. These observations support the involvement of structural proteins other than actin [31] in the maintenance of this structure. In agreement with the latter, quick-freeze deep-etch and transmission electron microscopy images have been obtained which are suggestive of molecular crosslinking of microtubules within the marginal band [32,33]. It is therefore postulated that MAPs of currently unknown identity contribute to the formation and maintenance of the platelet marginal band. Some candidates have been proposed over the last decade and will be discussed below, the most notable being the motor proteins kinesins and dyneins.

In some respects, the platelet marginal band resembles the microtubule organization in neuronal growth cones, which also adopts a

markedly bent conformation below the cell membrane [34]. One difference, however, is that they do not fully circle the bulbous termination and appear to have a single polarity, contrary to the mixed polarity observed in platelets. Another marginal band-like structure has been observed in the presynaptic terminal of *Drosophila* larval neuromuscular junctions, where a thick band of microtubules loops around the terminal periphery [35]. Nevertheless, these structures do not allow the cells to sustain a flat discoid shape and do not form a closed loop but rather a hooked configuration. A MAP1B homolog has been shown to be of major importance in the maintenance of this microtubule organization [36], suggesting by analogy the possible involvement of structural MAPs in the platelet marginal band.

3. Tubulin code in the platelet lineage

3.1. Tubulin isotypes

The platelet marginal band, like any other microtubule array, is composed of α - and β -tubulin heterodimers. A knowledge of the α - and β -isotype repertoire responsible for the assembly of this unusual cytoskeleton has been slow to emerge. The most divergent β -tubulin isotype, β 1-tubulin, was the first element found to be involved in this process. This isotype was initially identified by screening a mouse bone marrow cDNA library, and was subsequently shown to be restricted to the hematopoietic lineage [37,38]. Later, its expression was narrowed down to the megakaryocytic lineage under the control of tissue-specific transcription factors such as Nuclear Factor-Erythroid 2 [39]. Furthermore, its inactivation in the mouse and mutations in man were found to result in low platelet counts (thrombocytopenia), with enlarged platelets and abnormal marginal band formation [40,41]. In platelets, β 1-tubulin is commonly reported to represent 90% of the total β -tubulin, a notion derived from an early western blot analysis [38], but never confirmed in independent works. Recently, a more reliable platelet proteome quantification by mass spectrometry [42] has provided values closer to 50% of the total platelet β -tubulin. β 1-tubulin expression was also recently reported in the thyroid, although at much lower levels than in platelets [43]. Despite this weak expression, mutations in *TUBB1* can cause defects in thyroid formation during embryogenesis, in addition to defects in platelet formation.

Until recently, it was not known if certain α -tubulin isotypes could also play a role in platelet biogenesis and marginal band formation. The generic α 4A-tubulin and the most divergent α -tubulin isotype, α 8-tubulin, emerged as possible candidates when their transcript and protein levels were found to increase during human megakaryocyte maturation, similarly to those of β 1-tubulin (Fig. 1A) [44,45]. In platelets, the α 4A- and α 8-tubulin isotypes were estimated by quantitative mass spectrometry to represent around 30% and < 5% of the total α -tubulin, respectively [44]. Their hypothetical role received support when decreased platelet counts and abnormal marginal band formation were identified in a patient and a mouse strain carrying *TUBA4A* mutations [44] and later in several individuals with *TUBA8* mutations [45]. These defects resemble those caused by *TUBB1* mutations, suggesting a similar involvement of the two α -isotypes [41,44,45]. As compared to β 1-tubulin, these two α -isotypes have a wider tissue distribution, but their function in cells other than platelets is unclear. Our unpublished data [46] show that co-expression of α 4A- and β 1-tubulin is critical for assembly of the platelet marginal band, since their combined deletion in the mouse aggravates thrombocytopenia and induces loss of the typical disc-shaped morphology of the cells with severe disorganization of their marginal band. These studies focusing on the tubulin isotypes are beginning to unravel a platelet-specific tubulin code distinct from that of other specialized cells like neurons or ciliated cells.

An important question that remains to be addressed refers to the ability of the α 4A-, α 8- and β 1-tubulin isotypes to fine-tune the behavior of microtubules during the process of platelet biogenesis and marginal band formation. Tubulin isotypes have been shown to modulate the

dynamics of microtubules [47], however, such information remains extremely limited in the platelet lineage. Ectopic expression of the platelet-restricted β 1-tubulin in CHO cells [48], has been reported to drastically modify the dynamics and behaviors of the microtubule cytoskeleton. In particular, microtubules became overly stable, were prone to curvatures and concomitantly relocated to the cell periphery in a centrosome-independent fashion. This behavior is highly reminiscent to that observed in proplatelet-forming megakaryocytes and platelets. The results suggest that β 1-tubulin carry intrinsic features able to provide flexural resilience to microtubules. Concerning the α -isotypes, overexpression of the α 8-tubulin, the most divergent isotype of the α -tubulin family, but not the generic α 1A-tubulin, was reported to increase microtubule polymerization speed and to reduce their straightness in Neuro-2a cells [49]. Further computational analysis revealed that α 8-tubulin, as opposed to α 1A-tubulin, carries a negative-charge distribution in its H1-S2 loop, which is thought to affect the inter-protofilament affinity within the microtubule lattice and to account for the increased curvature [49]. Thus, tubulin isotypes appear to carry intrinsic structural features which allow to directly influence the dynamics and the mechanics of microtubules. Furthermore, tubulin isotypes also carry several post-translational modifications mainly in their C-terminal tails, which establish unique biochemical signatures involved in the binding of a number of MAPs that affect microtubule behavior [50].

3.2. Tubulin post-translational modifications

Acetylation, detyrosination and polymodifications (polyglutamylation and polyglycylation) are considered to be the post-translational modifications of main functional relevance [50]. Microtubules have been found to be acetylated and polyglutamylated, and to contain detyrosinated tubulins in circulating platelets (Fig. 1D) [26,51,52]. Although some of these post-translational modifications might have a role in platelet function, their importance in platelet formation and marginal band buildup remains hypothetical. A comprehensive analysis of the nature and level of each of these post-translational modifications throughout platelet biogenesis is currently lacking and will be required for their proper functional evaluation (Fig. 1A).

Recent studies have suggested that microtubule acetylation and polyglutamylation might play a part in platelet biogenesis. Acetylation was the first modification to be studied in the platelet lineage. This stemmed from the observation that the HDAC inhibitor Panobinostat induced thrombocytopenia in man and led to abnormal megakaryopoiesis with altered proplatelet formation *in vitro* [53,54]. Initially, these effects were thought to be caused by microtubule hyperacetylation. This hypothesis was however disputed, since overexpression of non-acetylatable tubulin in human cultured megakaryocytes, which artificially lowers tubulin acetylation levels, did not rescue proplatelet formation under HDAC6 inhibition. This observation thus strongly indicated that tubulin hyperacetylation, by itself, was not responsible for the defects induced by HDAC6 inhibition. Instead, they were found to be caused by hyperacetylation of cortactin, another HDAC6 target [55]. Interestingly, the HDAC6-cortactin axis is required for platelet biogenesis in man, but not in the mouse. This species difference probably explains why HDAC6-deficient mice exhibit no platelet formation defects [56]. Similarly, mice inactivated for the acetylase ATAT1 display normal platelet parameters despite an almost total absence of acetylation [56]. Normal formation of the microtubule marginal band in HDAC6- and ATAT1-deficient mice came as a surprise, since tubulin acetylation has been previously reported to decrease inter-protofilament interactions and to enhance microtubule flexibility [57,58]. This suggests that the microtubules of the marginal band do not require acetylation to curve and properly assemble under the plasma membrane. Taken together, it therefore seems that acetylation of tubulin does not play a major role in megakaryopoiesis, at variance with the findings for other biological processes such as mechanosensitivity in

response to touch or pain [59].

A role of tubulin polyglutamylation in platelet formation has also been hypothesized but the available studies do not firmly support its functional involvement. In experiments performed in a heterologous CHO cell model, polyglutamylation was reported to govern the formation of proplatelet- and marginal band-like structures [52]. However, the proplatelet-like elements observed in this model substantially differ from those of *bona fide* megakaryocyte-derived proplatelets since: i) they do not exhibit the thin and dense microtubule bundle arrangement along their shaft; ii) their coiled sub-membranous marginal band-like structure clearly differs from that in megakaryocyte-derived proplatelets; and iii) they have not been described as being able to release platelet-like elements. In view of these differences, caution is taken against directly translating these findings to the native process. In another study, mice deficient in the deglutamylase CCP6 exhibited increased platelet counts and increased numbers of low-ploidy megakaryocytes, thereby suggesting that enhanced microtubule polyglutamylation could have an overall positive effect on platelet formation [60]. This hypothesis was nevertheless abandoned in favor of a mechanism involving Mad2, a known regulator of mitosis [61] identified as a novel CCP6 target [60]. In support of this, it was found that CCP6-deficient megakaryocyte progenitors expressing a non-glutamylatable form of Mad2, transplanted into irradiated wild type recipient mice, restored normal megakaryocyte numbers and ploidy when compared to CCP6-deficient megakaryocyte progenitors expressing normal Mad2 [60]. At this early stage of our knowledge, tubulin polyglutamylation still remains a possible factor in platelet formation in view of the many enzymes, both glutamylases and deglutamylases, able to compensate for the inactivation of a single enzyme [62]. Thus, functional analyses in the platelet lineage will require simultaneous manipulation of several enzymes.

Very little is known concerning the role of detyrosination in platelet biogenesis. This modification was however shown to influence the binding or activity of motor proteins *in vitro* and *in vivo* [63–65]. In this regard, tubulin detyrosination could therefore influence proplatelet and marginal band formation. The latter hypothesis has not yet been confirmed, but the recent identification of the SVBP/VASH detyrosinase complex [66,67] and generation of mouse knockouts [68] have opened the way to directly tackle this question. However, evaluation of the part played by the tyrosinase TTL will require its targeted inactivation in the platelet lineage since mice with a total knockout die at birth [69]. Care will additionally be required since tubulin tyrosination and detyrosination levels can be indirectly modulated through *de novo* synthesis of α -tubulin isotypes, which do not genetically encode a C-terminal tyrosine residue, such as α 4A- and α 8-tubulin.

Tubulin polyglycylation, classically observed in cilia and flagella, was recently detected in human CD34⁺ iPSC-derived megakaryocytes but its function in the platelet lineage remains essentially unknown [70]. Interestingly, this modification is however lost in circulating mature platelets [70]. Here again, the generation of enzyme-deficient mice, most likely multiple knockouts, should help to determine the involvement and importance of polyglycylation in platelet formation.

Finally, although they have not been thoroughly characterized, non-conventional post-translational modifications of tubulin such as phosphorylation and palmitoylation have been detected in platelets. The presence of tubulin phosphorylation is nonetheless controversial [71, 72] and its function in megakaryocytes is as yet unknown. Tubulin palmitoylation was first discovered in human platelets [73], and has since been proposed to participate in the membrane localization of tubulin [74]. Its role in platelet biogenesis still remains to be elucidated. Tubulin methylation, amination, sumoylation and ubiquitination, which have been described in other cell types, have not yet been detected, nor studied, in platelets.

3.3. Microtubule-associated proteins

Microtubule-associated proteins (MAPs) are important in numerous

cellular functions ensured by microtubules. Accordingly, it is hypothesized that a specific group of MAPs might be required for the unique process of platelet formation. To date, however, only a few MAPs have been found to play a role in this process, either in the early stages of progenitor commitment to the megakaryocytic lineage, in megakaryocyte maturation and polyploidization, or in proplatelet and platelet formation.

Mouse megakaryocytes grown *in vitro* extend proplatelets through a mechanism that requires forces generated by motor proteins to allow the microtubules to slide relative to one another [15]. This mechanism is governed by dynein-dynactin complexes which have been found to associate with microtubules in murine proplatelets generated *in vitro*. Consistent with this scheme, proplatelet formation was prevented by treatment with dynein inhibitors or overexpression of the dynein subunit dynamitin [14,15]. However, it has not yet been demonstrated that this model applies similarly to *in vivo* generated proplatelets, which exhibit different ultrastructural and mechanical properties. Kinesins, the second major class of motor proteins, are responsible for transport of organelles to the end of proplatelets [75]. The specific kinesin(s) involved in this process are still unknown. A mouse model lacking Kif5b (kinesin-1 heavy chain) in hematopoietic cells displays normal platelet counts, volumes and morphology and no defect in their granule contents [76]. Although this particular kinesin appears to be dispensable for platelet shape, other isoforms could nevertheless play a role in the formation and maintenance of the marginal band in circulating platelets, since the kinesin inhibitor aurintricarboxylic acid caused the microtubule marginal band of human platelets to shrink and decrease in diameter [77]. Although the specificity of this inhibitor is broad and not exclusive to kinesins, this could suggest that the crosslinks between microtubules of the marginal band previously observed by electron microscopy may be composed of as yet unidentified kinesins, which interestingly are able to buckle and loop microtubules *in vitro* [78,79].

RanBP10, a cytoplasmic guanine nucleotide exchange factor which modulates non centrosomal microtubules, has been identified as a β 1-tubulin partner using a yeast two-hybrid screen [80]. Its overexpression in human megakaryocytes produces abnormally thick bundles of microtubules, and while its inactivation in the mouse translates into slightly decreased proplatelet production *in vitro*, it does not translate into decreased platelet counts *in vivo* [80,81]. Ultrastructural analysis of RanBP10-deficient platelets nonetheless revealed some disorganization of the marginal band and a less discoid appearance. These results indicate that RanBP10 is dispensable for megakaryocyte maturation and platelet biogenesis but plays a part in maintaining platelet shape. Mechanistically, it is not known whether or how the GTPase activity of RanBP10 affects microtubule assembly in platelets. One possibility is that RanGTP could modulate the activity of motor proteins in megakaryocytes and platelets, similarly to its effect on the kinesin Eg5 in *Xenopus* oocytes [82].

Stathmin is a tubulin-sequestering protein, which promotes microtubule depolymerization, and which plays an important role in the regulation of the mitotic spindle. In human cultured megakaryocytes, it was found that stathmin downregulation must occur to allow for proper megakaryocyte maturation [83]. In support of this, expression of a constitutively active form of stathmin delays cytoplasmic maturation, reduces polyploidization and impairs proplatelet production [83]. In mice, stathmin deficiency results in a moderate decrease in blood platelet count in young individuals which progresses to thrombocytosis and enlarged platelets in aged animals [84]. These data suggest that the control of microtubule dynamics by stathmin is important for platelet biogenesis in mice and humans.

Adenomatous polyposis coli (APC) is a microtubule plus-end tracking protein involved in the regulation of microtubules in a number of cell systems. Its knockdown in mouse dorsal root ganglion neurons leads to microtubule looping in the growth cone of neurons, a structural arrangement reminiscent of the marginal band of platelets [85]. In the platelet lineage, downregulation of APC by RNA

interference in cultured human megakaryocytes or its inactivation in knockout mice results in increased ploidy and amplification of the proplatelet network [86]. Consequently, APC-deficient mice exhibit increased platelet counts. The platelet ultrastructure nevertheless remains normal, with a well-organized marginal band of microtubules. One possible mechanism to explain the elevated platelet count in the absence of APC could relate to its capacity to stabilize the growing ends of microtubules through its interaction with EB1 and mDia (Diaphanous).

mDia1 is a conserved member of the formin protein family which mediates the Rho GTPase-dependent assembly of F-actin and microtubules during cytoskeletal remodeling. RNAi knockdown of mDia1 in cultured human megakaryocytes results in increased proplatelet formation, while expression of a constitutively active form of mDia1 inhibits it [87]. In addition, patients expressing gain-of-function mutants of mDia1 exhibit macrothrombocytopenia (low platelet counts with enlarged platelets) together with decreased proplatelet formation *in vitro* [88]. Interestingly, the patients also harbor an abnormal platelet marginal band with increased numbers of microtubules, suggesting that mDia1 is able to modulate the stability of microtubules in this structure. The way in which mDia1 contributes to microtubule dynamics is still a matter of debate but could involve their stabilization through EB1 and APC, or regulation of GSK3beta [89]. The mechanisms appear to differ between man and mouse, since mDia1-deficient mice paradoxically display macrothrombocytopenia and reduced proplatelet formation *in vitro* [90].

CLASP1 and CLASP2 are microtubule plus-end tracking proteins, selectively stabilizing microtubules at the cell edge [91]. CLASP2 deficiency in the mouse leads not only to thrombocytopenia, but also to progressive anemia and pancytopenia [92]. In particular, CLASP2 deficiency causes defects in every layer of the hematopoietic lineage with notably decreased thrombopoietin receptor expression and reduced megakaryocyte ploidy levels. Interestingly, *in vitro* proplatelet formation appears to be unaffected. This indicates that CLASP2, although essential for the early steps of platelet biogenesis, is dispensable in its final stages. The reason behind this strict early requirement might be related to the ability of CLASPs to stabilize and repair damages in the microtubule lattice, and suppress catastrophe events [93,94].

GEF-H1 is a Rho guanine nucleotide exchange factor that mediates actin cytoskeleton remodeling by microtubules [95]. Its activity is regulated by its association to microtubules: GEF-H1 is inactive when bound to microtubules, and becomes active when released following microtubule depolymerization. In mouse megakaryocytes, GEF-H1 must be downregulated to prevent RhoA activation and cytokinesis, thereby promoting their entry into the endomitotic cycle. As a consequence, mouse megakaryocytes expressing GEF-H1 ectopically are less polyploid [96], which raises the possibility that altering microtubule dynamics could, by impacting GEF-H1 activity, affect the polyploidization and overall maturity of megakaryocytes. This hypothesis is in line with the decreased ploidy levels observed in cultured human megakaryocytes expressing a constitutively active form of stathmin, which prevents proper microtubule polymerization in these cells [83]. Although not demonstrated, the same could happen in CLASP2-deficiency, which also alters microtubule stability [92,93]. Lower microtubule mass could drive up GEF-H1 activity, leading to a delayed megakaryocyte entry into the endomitotic cycle and explain their decreased polyploidization potential.

Nardilysin is a metalloproteinase known to regulate axonal maturation and to localize to microtubular structures in oocytes and spermatids [97,98]. Recently, it was reported to interact with β 1- and α 4A-tubulins in megakaryocytes and has been proposed to intervene in the final stage of platelet release from cultured megakaryocytes in the presence of shear stress [99].

The microtubule-actin crosslinking factor 1 (MACF1) is a cytoskeletal cross-linker of the spectraplakins family. MACF1 is essential for embryo development and plays pivotal functions in many cell types like

neurons and cardiomyocytes [100]. This protein however appears to be dispensable in the platelet lineage, since megakaryocyte-restricted MACF1-deficiency does not impair platelet and marginal band formation [101]. This might be due to compensations by other microtubule-actin cross-linkers such as Gas2L1 [101]. Interestingly, however, mice deficient for other actin-binding proteins with functional links to microtubules, such as filamin A and profilin, exhibit decreased platelet numbers and show altered marginal bands with higher numbers of microtubule coils [102,103]. This suggests that actin could, nonetheless indirectly, regulate microtubules and therefore platelet biogenesis and marginal band buildup. The exact mechanism and the extent of the crosstalks between the two cytoskeletons in the platelet lineage are however still unknown. It is possible that actin and tubulin both compete for these factors in the cells [104], achieving a two-sided balance whose alterations would reverberate onto the entire cytoskeleton.

4. Platelet tubulinopathies

Mutations in any of seven tubulin isotypes (*TUBA1A*, *TUBA3E*, *TUBA8*, *TUBB2A*, *TUBB2B*, *TUBB3* or *TUBB5*) lead to diseases known as tubulinopathies, essentially presenting as a range of brain malformations [105]. Tubulinopathies affecting the platelet lineage have also been reported in recent years and have been linked to mutations in β 1-tubulin in patients with inherited macrothrombocytopenia. Apart from a few common variants, these mutations usually have an allele frequency of less than 0.001% and occur as a heterozygous trait.

The first reported *TUBB1* mutation was a p.Gln43Pro substitution, identified in patients with unexplained macrothrombocytopenia, but also in healthy individuals [106]. The first variant to be clearly associated with a thrombocytopenic phenotype was a heterozygous p.Arg318Trp substitution in β 1-tubulin [41]. Since this early report, a total of 26 *TUBB1* mutations have been documented, mainly substitutions (Table 1). In all individuals, the defect was found to be restricted to the platelet lineage, except in a few cases. Three mutations were notably identified in a syndromic form associating the production of macroplatelets and thyroid dysgenesis, thus revealing an unsuspected role of this isotype outside the platelet lineage [43]. The majority of the *TUBB1* mutations identified to date are located in the structured portion of the protein, with only two directly affecting the more labile C-terminal segment (p.Leu361Alafs*19 and p.Q423*). All are predicted to cause disease, but only a few have been assessed functionally. In these cases, the mutations appeared to impair β 1-tubulin assembly into microtubules [41,107–110], prevent assembly of microtubules [108] or reduce proplatelet formation *in vitro* [108–110].

Until recently, *TUBB1* was the only gene known to be linked to platelet tubulinopathies. However, high throughput screening of blood donors with low platelet counts has now identified one individual carrying *TUBA4A* c.541 G>A and c.547 G>C substitutions (p.Val181Met and p.Glu183Gln) [44]. Moreover, a *Tuba4a* mutant mouse (p.Val260-Glu) showed mild macrothrombocytopenia and marginal band disorganization, revealing the involvement of this more widely expressed isotype in platelet biogenesis. As these mutations were found only in a single individual, more studies of this gene will be needed to identify further cases of hereditary macrothrombocytopenia due to defects in *TUBA4A*. The same strategy of high throughput screening of blood donors with low platelet counts has even more recently allowed the identification of six point mutations in the *TUBA8* gene linked to macrothrombocytopenia and abnormal marginal band organization, thereby unveiling a role of this poorly studied isotype in correct platelet formation [45].

5. Conclusions and perspectives

Although megakaryocyte and platelet microtubules are unique in many regards, our knowledge of the molecular determinants governing

Table 1

Tubulin mutations in the platelet lineage, Known tubulin isotype mutations associated with platelet disorders. For each mutation, the nucleotide and amino-acid changes, the exon affected, the Rs ID and its corresponding Mean Allele Frequency (GnomAD_Exome database), the phenotype reported in the carrier individuals and the ability of mutated tubulins to incorporate into the microtubule network are indicated. *GnomAD database; ** TOPMED database; ***ALFA Project database; ****KoreanK database; – not available. † Mutations previously compiled in [113].

Nucleotide change	Amino acid change	Exon	Rs ID	MAF	Phenotype	Incorporation into microtubules?	Ref
<i>α4A-tubulin</i>							
c.541 G>A	p.Val181Met	4	rs757373635	0.000139	Macrothrombocytopenia and abnormal marginal band	–	[44,112]
c.547 G>C	p.Glu183Gln		rs775821469	0.000008			
<i>α8-tubulin</i>							
c.59 G>A	p.Cys20Tyr	2	–	–	Thrombocytopenia	No	[45,112]
c.202 A>C	p.Ile68Leu	2	rs776983625	0.000068	Thrombocytopenia In combination with the TUBB1 p.Gly146Arg mutation	No	[45,112]
c.640 C>T	p.Arg214Cys	4	rs567801441	0.000171	Macrothrombocytopenia with abnormal marginal band	Altered	[45,112]
c.727 C>T	p.Arg243Cys	4	rs762265885	0.000072	Macrothrombocytopenia with abnormal marginal band	No	[45,112]
c.868 G>A	p.Glu290Lys	4	rs754515296	0.000036	Macrothrombocytopenia with abnormal marginal band	Altered	[45]
c.958 C>T	p.Arg320Trp	4	rs140202346	0.00019*	Thrombocytopenia	No	[45,112]
<i>β1-tubulin</i>							
c.35delG	p.Cys12Leufs* 12	1	rs773248042	0.000032	Macrothrombocytopenia and hypothyroidism	–	[43,110, 113] [†]
c.58–2 A>G	–	–	rs1361708566	0.000008	Thrombocytopenia Increased prevalence in patients with macrothrombocytopenia	–	[112]
c.128_129delAGinsCC	p.Gln43Pro	2	–	–	Decreased risks of cardiovascular disease in men Increased risks of intracerebral hemorrhages in men	Altered	[106, 113] [†]
c.185 G>A	p.Arg62Gln	3	rs749343000	0.000004	Macrothrombocytopenia and mild bleeding disorders	–	[114]
c.318 C>G	p.Tyr106 *	4	rs560702757	0.000004	Macroplatelets and Hypothyroidism	–	[43]
c.319 A>C	p.Thr107Pro	4	rs752079894	0.000048	Macrothrombocytopenia	No	[110, 113] [†]
c.326 G>A	p.Gly109Glu	4	rs41303899	0.000871	Macrothrombocytopenia	No	[110, 113] [†]
c.436 G>A	p.Gly146Arg	4	rs371852125	0.000036	Macrothrombocytopenia	–	[107,115]
c.445 A>C	p.Thr149Pro	4	–	–	Thrombocytopenia Genomic instability	No	[108]
c.479 C>T	p.Pro160Leu	4	rs759117911	0.000004	Macroplatelets and hypothyroidism	No	[43]
c.721 C>T	p.Arg241Trp	4	rs368923302	0.000091	Thrombocytopenia and mild bleeding disorders In combination with the TPM4 p.Ala183Val mutation:	–	[113] [†]
c.726 C>G	p.Phe242Leu	4	rs890185415	0.000032**	Thrombocytopenia associated with mild bleeding disorders	–	[113, 116] [†]
c.752 G>A	p.Arg251His	4	rs770226644	0.00003***	Thrombocytopenia and genomic instability	No	[108]
c.779 T > C	p.Phe260Ser	4	rs1057517996	0.0022****	Macrothrombocytopenia	No	[109, 113] [†]
c.806 G>A	p.Gly269Asp	4	rs1293743818	0.000004	Macrothrombocytopenia with abnormal marginal band	No	[110]
c.821 C>T	p.Thr274Met	4	rs35565630	0.017768	Protective against paclitaxel-induced thrombocytopenia	Yes	[113, 117] [†]
c.844 C>T	p.Arg282*	4	rs145922879	0.000032	Thrombocytopenia	–	[112]
c.916 C>T	p.Arg306Cys	4	rs192115302	0.000386	Thrombocytopenia Increased risks of treatment failure for immune-thrombocytopenia.	–	[112]
c.920 G>A	p.Arg307His	4	rs6070697	0.174998	More severe thrombocytopenia in Bernard-Soulier Bolzano patients.	–	[113] [†]
c.952 C>T	p.Arg318Trp	4	rs121918555	0.000068	Macrothrombocytopenia	No	[41,113] [†]
c.959 A>T	p.Lys320Met	4	–	–	Thrombocytopenia	–	[112]
c.1041 C>G	p.Asn347Lys	4	rs1421750582	0.000008**	Macrothrombocytopenia	–	[114]
c.1042_1044delAAC	p.Asn348del	4	rs773185354	–	Thrombocytopenia	–	[112]
c.1075 C>T	p.Arg359Trp	4	rs140943896	0.006583	Macrothrombocytopenia	Altered	[110, 113] [†]
c.1080dup	p.Leu361Alafs* 19	4	rs1300096139	–	Macrothrombocytopenia and mild bleeding disorders	–	[113] [†]
c.1267 C>T	p.Gln423*	4	rs767041023	0.000012	Macrothrombocytopenia	–	[110, 113] [†]

their role in platelet biogenesis is far from complete. Progress has been made over the last twenty years concerning the mechanisms involved in polyploidization, proplatelet elongation and marginal band formation. Tubulin isotypes were the first members of the tubulin code to receive attention in the platelet lineage. However, it is still not known exactly how they contribute to these processes, particularly to the extreme bending of the microtubule lattice in the marginal band. Tubulin isotypes have been shown to carry distinctive structural features which modulate factors controlling the properties and assembly of microtubules, such as the protofilament number and lattice stability [111]. The $\alpha 4A$ -, $\alpha 8$ - and $\beta 1$ -tubulin isotypes may thus confer on microtubules specific conformations able to withstand exceptional curvatures, but this remains to be demonstrated.

More importantly, tubulin isotypes also modulate microtubule functions through the many post-translational modifications. There is nevertheless still much to discover regarding the types and functions of these modifications in the platelet lineage. Among them, tubulin detyrosination deserves special attention. In particular, *TUBA4A* and *TUBA8* both encode isotypes lacking the typical C-terminal tyrosine residue of α -tubulins, which mimic the enzymatically detyrosinated proteins. Interestingly, these isotypes also reach their highest levels of expression towards the final stages of platelet biogenesis. The $\alpha 4A$ - and $\alpha 8$ -tubulin isotypes might therefore exert their influence through tubulin detyrosination and the subsequent modifications of the C-terminal tail, $\Delta 2$ and $\Delta 3$. In addition, these isotypes could also achieve their functions through tubulin polyglutamylation, of which very little is known currently in the platelet lineage. The recent development of enzyme-deficient mice will certainly provide the answers in the near future. Polyglutamylation will however likely require multiple knock-outs to be properly assessed, which would allow to account for potential enzymatic compensations.

One of the most challenging unresolved questions relates to the identity of the MAPs required for platelet biogenesis and how they are regulated by tubulin isotypes and post-translational modifications. An important difficulty in addressing this question is that the mechanism of platelet formation in cultured megakaryocytes appears to differ from that occurring *in vivo*, particularly with regard to proplatelet elongation. Answering this question will require improvements in the culture conditions to better mimic the native process and take into account the effect of the bone marrow stiffness on megakaryocyte maturation and of flow on platelet liberation by proplatelets, but will also require more refined tools to study platelet production *in vivo*. This effort is not only justified on fundamental grounds to decipher the mechanisms at stake, but also to improve our capacity to produce platelets in culture for transfusion purposes and to better manage patients presenting platelet diseases. Although focused on a very specialized cell and physiological process, this research may also be expected to shed new light and generate new concepts in the general field of microtubules.

Funding

This work was supported by the University of Strasbourg, the Fondation pour la Recherche Médicale (grant FDT202106013085 to QK), the Établissement Français du Sang and the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM).

Acknowledgments

We thank warmly our collaborators Sylvie Moog and Léa Mallo for helpful discussions and technical assistance. We wish to thank Maria M. Magiera and Carsten Janke for the excellent discussions. We also thank Tatjana Hirschmugl for the illustrations, and Juliette Mulvihill for reviewing the English of the manuscript.

Declaration of interest

None. The authors declare no competing interests.

References

- [1] P.E.J. van der Meijden, J.W.M. Heemskerck, Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives, *Nat. Rev. Cardiol.* 16 (2019) 166–179, <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0110-0>.
- [2] S. Mazzi, L. Lordier, N. Debili, H. Raslova, W. Vainchenker, Megakaryocyte and polyploidization, *Exp. Hematol.* 57 (2018) 1–13, <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2017.10.001>.
- [3] A. Sharda, R. Flaumenhaft, The life cycle of platelet granules, *F1000Research* 7 (2018) 1–12, (<http://openr.es/b4f>).
- [4] A. Eckly, H. Heijnen, F. Pertuy, W. Geerts, F. Proamer, J.Y. Rinckel, C. Léon, F. Lanza, C. Gachet, Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes, *Blood* 123 (2014) 921–930, <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-492330>.
- [5] J. Boscher, I. Guinard, A. Eckly, F. Lanza, C. Léon, Blood platelet formation at a glance, *J. Cell Sci.* 133 (2020) 1–8, <https://doi.org/10.1242/jcs.244731>.
- [6] O. Behnke, Further studies on microtubules. A marginal bundle in human and rat thrombocytes, *J. Ultrastruct. Res.* 13 (1965) 469–477, [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(65\)90009-2](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(65)90009-2).
- [7] O. Behnke, An electron microscope study of the rat megakaryocyte. II. Some aspects of platelet release and microtubules, *J. Ultrastruct. Res.* 26 (1969) 111–129, [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(69\)90039-2](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(69)90039-2).
- [8] I.S. Hitchcock, K. Kaushansky, Thrombopoietin from beginning to end, *Br. J. Haematol.* 165 (2014) 259–268, <https://doi.org/10.1111/bjh.12772>.
- [9] N. Debili, F. Wendling, A. Katz, J. Guichard, J. Breton-Gorius, P. Hunt, W. Vainchenker, The Mpl-ligand or thrombopoietin or megakaryocyte growth and differentiative factor has both direct proliferative and differentiative activities on human megakaryocyte progenitors, *Blood* 86 (1995) 2516–2525, <https://doi.org/10.1182/blood.v86.7.2516.2516>.
- [10] P.J. Handagama, B.F. Feldman, N.C. Jain, T.B. Farver, C.S. Kono, *In vitro* platelet release by rat megakaryocytes: effect of metabolic inhibitors and cytoskeletal disrupting agents, *Am. J. Vet. Res.* 48 (1987) 1142–1146.
- [11] F. Tablin, M. Castro, R.M. Leven, Blood platelet formation *in vitro*. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation, *J. Cell Sci.* 97 (1990) 59–70.
- [12] P.E. Stenberg, T.P. McDonald, C.W. Jackson, Disruption of microtubules *in vivo* by vincristine induces large membrane complexes and other cytoplasmic abnormalities in megakaryocytes and platelets of normal rats like those in human and Wistar Furth rat hereditary macrothrombocytopenias, *J. Cell. Physiol.* 162 (1995) 86–102, <https://doi.org/10.1002/jcp.1041620111>.
- [13] A. Bornert, J. Boscher, F. Pertuy, A. Eckly, D. Stegner, C. Strassel, C. Gachet, F. Lanza, C. Léon, Cytoskeletal-based mechanisms differently regulate *in vivo* and *in vitro* proplatelet formation, *Haematologica* 106 (2021) 1368–1380, <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.239111>.
- [14] S.R. Patel, J.L. Richardson, H. Schulze, E. Kahle, N. Galjart, K. Drabek, R. A. Shivdasani, J.H. Hartwig, J.E. Italiano, Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes, *Blood* 106 (2005) 4076–4085, <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2204>.
- [15] M. Bender, J.N. Thon, A.J. Ehrlicher, S. Wu, L. Mazutis, E. Deschmann, M. Sola-Visner, J.E. Italiano, J.H. Hartwig, Microtubule sliding drives proplatelet elongation and is dependent on cytoplasmic dynein, *Blood* 125 (2015) 860–868, <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-600858>.
- [16] J.E. Italiano Jr., P. Lecine, R.A. Shivdasani, J.H. Hartwig, Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes, *J. Cell Biol.* 147 (1999) 1299–1312, <https://doi.org/10.1083/jcb.147.6.1299>. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2168104/pdf/9909028.pdf>).
- [17] A. Balduini, I. Pallotta, A. Malara, P. Lova, A. Pecci, G. Viarengo, C.L. Balduini, M. Torti, Adhesive receptors, extracellular proteins and myosin IIA orchestrate proplatelet formation by human megakaryocytes, *J. Thromb. Haemost.* 6 (2008) 1900–1907, <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03132.x>.
- [18] E. Brown, L.M. Carlin, C. Nerlov, C. Lo Celso, A.W. Poole, Multiple membrane extrusion sites drive megakaryocyte migration into bone marrow blood vessels, *Life Sci. Alliance* 1 (2018) 1–12, <https://doi.org/10.26508/lsa.201800061>.
- [19] T. Junt, H. Schulze, Z. Chen, S. Massberg, T. Goerge, A. Krueger, D.D. Wagner, T. Graf, J.E.I. Jr, R.A. Shivdasani, U.H. Von Andrian, Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow, *Science* 350 (2007) 1767–1771.
- [20] E. Lefrançois, 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. Passegue, M.R. Looney, The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors, *Nature* 544 (2017) 105–109, <https://doi.org/10.1038/nature21706>.
- [21] D.D. Sabatini, K. Bensch, R.J. Barnett, Enzyme cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation, *J. Cell Biol.* 17 (1963) 19–58, <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.19>.
- [22] J.G. White, G.H.R. Rao, Microtubule coils versus the surface membrane cytoskeleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape, *Am. J. Pathol.* 152 (1998) 597–609.

- [23] M. Steiner, Y. Ikeda, Quantitative assessment of polymerized and depolymerized platelet microtubules. Changes caused by aggregating agents, *J. Clin. Invest* 63 (1979) 443–448, <https://doi.org/10.1172/JCI109321>.
- [24] O. Behnke, T. Zelander, Filamentous substructure of microtubules of the marginal bundle of mammalian blood platelets, *J. Ultrastruct. Res.* 19 (1967) 147–165, [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(67\)80065-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(67)80065-0).
- [25] V.T. Nachmias, Cytoskeleton of human platelets at rest and after spreading, *J. Cell Biol.* 86 (1980) 795–802, <https://doi.org/10.1083/jcb.86.3.795>.
- [26] S. Patel-Hett, J.L. Richardson, H. Schulze, K. Drabek, N.A. Isaac, K. Hoffmeister, R.A. Shivdasani, J.C. Bulinski, N. Galjart, J.H. Hartwig, J.E. Italiano, Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules, *Blood* 111 (2008) 4605–4616, <https://doi.org/10.1182/blood-2007-10-118844>.
- [27] A. Mathur, S.R. Correia, S. Dmitrieff, R. Gibeaux, I. Kalinina, T. Quidwai, J. Ries, F. Nedelec, B.G. Alhoughi, Cytoskeleton mechanics determine resting size and activation dynamics of platelets, *BioRxiv* (2017). (<https://doi.org/10.1101/413377>).
- [28] F. Gittes, B. Mickey, J. Nettleton, J. Howard, Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape, *J. Cell Biol.* 120 (1993) 923–934, <https://doi.org/10.1083/jcb.120.4.923>.
- [29] D.M. Kenney, R.W. Linck, The cytoskeleton of unstimulated blood platelets: structure and composition of the isolated marginal microtubular band, *J. Cell Sci.* 78 (1985) 1–22.
- [30] J.D. Kowitz, R.W. Linck, D.M. Kenney, Isolated cytoskeletons of human blood platelets: dark-field imaging of coiled and uncoiled microtubules, *Biol. Cell* 64 (1988) 283–291, [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(88\)90002-0](https://doi.org/10.1016/0248-4900(88)90002-0).
- [31] R.B. Vallee, G.G. Borisy, Removal of the projections from cytoplasmic microtubules in vitro by digestion with trypsin, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 377–382, [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)32839-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)32839-9).
- [32] T. Nakata, N. Hirokawa, Cytoskeletal reorganization of human platelets after stimulation revealed by the quick-freeze deep-etch technique, *J. Cell Biol.* 105 (1987) 1771–1780, <https://doi.org/10.1083/jcb.105.4.1771>.
- [33] J. Boyles, J.E.B. Fox, D.R. Phillips, P.E. Stenberg, Organization of the cytoskeleton in resting, discoid platelets: preservation of actin filaments by a modified fixation that prevents osmium damage, *J. Cell Biol.* 101 (1985) 1463–1472, <https://doi.org/10.1083/jcb.101.4.1463>.
- [34] O.I. Kahn, P.W. Baas, Microtubules and growth cones: motors drive the turn, *Trends Neurosci.* 39 (2016) 433–440, <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.04.009>.
- [35] F.J. Bodaleo, C. Gonzalez-Billault, The presynaptic microtubule cytoskeleton in physiological and pathological conditions: lessons from drosophila fragile X syndrome and hereditary spastic paraplegias, *Front. Mol. Neurosci.* 9 (2016) 1–16, <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00060>.
- [36] J. Roos, T. Hummel, N. Ng, C. Klämbt, G.W. Davis, Drosophila futsch regulates synaptic microtubule organization and is necessary for synaptic growth, *Neuron* 26 (2000) 371–382, [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81170-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81170-8).
- [37] D. Wang, A. Villasante, S.A. Lewis, N.J. Cowan, The mammalian β -tubulin repertoire: hematopoietic expression of a novel, heterologous β -tubulin isotype, *J. Cell Biol.* 103 (1986) 1903–1910, <https://doi.org/10.1083/jcb.103.5.1903>.
- [38] S.A. Lewis, W. Gu, N.J. Cowan, Free intermingling of mammalian β -tubulin isotypes among functionally distinct microtubules, *Cell* 49 (1987) 539–548, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90456-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90456-9).
- [39] P. Lecine, J. Italiano, S.W. Kim, J.L. Villevale, R.A. Shivdasani, Hematopoietic-specific $\beta 1$ tubulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2, *Blood* 96 (2000) 1366–1373, <https://doi.org/10.1182/blood.v96.4.1366.h8001366.1366.1373>.
- [40] H.D. Schwer, P. Lecine, S. Tiwari, J.E. Italiano, J.H. Hartwig, R.A. Shivdasani, A lineage-restricted and divergent β -tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets, *Curr. Biol.* 11 (2001) 579–586, [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00153-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00153-1).
- [41] S. Kunishima, R. Kobayashi, T.J. Itoh, M. Hamaguchi, H. Saito, Mutation of the $\beta 1$ -tubulin gene associated with congenital macrothrombocytopenia affecting microtubule assembly, *Blood* 113 (2009) 458–461, <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-162610>.
- [42] J.M. Burkhardt, M. Vaudel, S. Gambaryan, S. Radau, U. Walter, L. Martens, J. Geiger, A. Sickmann, R.P. Zahedi, The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways, *Blood* 120 (2012) 73–83, <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-416594>.
- [43] A. Stoupa, F. Adam, D. Kariyawasam, C. Strassel, S. Gawade, G. Szinnai, A. Kauskot, D. Lasne, C. Janke, K. Natarajan, A. Schmitt, C. Bole-Feysot, P. Nitschke, J. Léger, F. Jabot-Hanin, F. Tores, A. Michel, A. Munnich, C. Besmond, R. Scharfmann, F. Lanza, D. Borgel, M. Polak, A. Carré, TUBB1 mutations cause thyroid dysgenesis associated with abnormal platelet physiology, *EMBO Mol. Med.* 10 (2018) 1–18, <https://doi.org/10.15252/emmm.201809569>.
- [44] C. Strassel, 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, F. Lanza, An essential role for $\alpha 4$ -tubulin in platelet biogenesis, *Life Sci. Alliance* 2 (2019), <https://doi.org/10.26508/LSA.201900309>.
- [45] Q. Kimmerlin, A. Dupuis, S. Bodakuntla, C. Weber, V. Heim, V. Henriot, S. Moog, A. Eckly, P. Guéguen, C. Ferec, C. Gachet, C. Janke, F. Lanza, Mutations in the most divergent α -tubulin isotype, $\alpha 8$ -tubulin, cause defective platelet biogenesis, *J. Thromb. Haemost.* 20 (2022) 461–469, <https://doi.org/10.1111/jth.15573>.
- [46] Q. Kimmerlin, S. Moog, A. Yakusheva, A. Eckly, C. Strassel, P. Mangin, C. Gachet, F. Lanza, Combined $\alpha 4$ - and $\beta 1$ -tubulin deficiencies profoundly affect platelet biogenesis and haemostasis [abstract], *Res. Pr. Thromb. Haemost.* 4 (2020). (<https://abstracts.isth.org/abstract/combined-alpha4-and-beta1-tubulin-deficiencies-profoundly-affect-platelet-biogenesis-and-haemostasis/>). Accessed May 10, 2021.
- [47] A. Vemu, J. Atherton, J.O. Spector, C.A. Moores, A. Roll-Mecak, Tubulin isoform composition tunes microtubule dynamics, *Mol. Biol. Cell.* 28 (2017) 3564–3572, <https://doi.org/10.1091/mbc.e17-02-0124>.
- [48] H. Yang, A. Ganguly, S. Yin, F. Cabral, Megakaryocyte lineage-specific class VI β -tubulin suppresses microtubule dynamics, fragments microtubules, and blocks cell division, *Cytoskeleton* 68 (2011) 175–187, <https://doi.org/10.1002/cm.20503>.
- [49] R. Belvindrah, K. Natarajan, P. Shabajee, E. Bruel-Jungerman, J. Bernard, G. Goutierre, I. Moutkine, X.H. Jaglin, M. Savariradjane, T. Irinopoulou, J.-C. Poncer, C. Janke, F. Francis, Mutation of the α -tubulin Tuba1a leads to straighter microtubules and perturbs neuronal migration, *J. Cell Biol.* 216 (2017) 2443–2461, <https://doi.org/10.1083/jcb.201607074>.
- [50] C. Janke, M.M. Magiera, The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21 (2020) 307–326, <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0214-3>.
- [51] G.G. Gundersen, J.C. Bulinski, Microtubule arrays in differentiated cells contain elevated levels of a post-translationally modified form of tubulin, *Eur. J. Cell Biol.* 42 (1986) 288–294. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3545837>).
- [52] J. van Dijk, G. Bompard, J. Cau, S. Kunishima, G. Rabeharivelo, J. Mateos-Langerak, C. Cazevielle, P. Cavelier, B. Boizet-Bonhoure, C. Delsert, N. Morin, Microtubule polyglutamylation and acetylation drive microtubule dynamics critical for platelet formation, *BMC Biol.* 16 (2018) 1–17, <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0584-6>.
- [53] L. Ellis, Y. Pan, G.K. Smyth, D.J. George, C. McCormack, R. Williams-Truax, M. Mita, J. Beck, H. Burris, G. Ryan, P. Atadja, D. Butterfoss, M. Dugan, K. Culver, R.W. Johnstone, H.M. Prince, Histone deacetylase inhibitor panobinostat induces clinical responses with associated alterations in gene expression profiles in cutaneous T-cell lymphoma, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 4500–4510, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4262>.
- [54] C. Iancu-Rubin, D. Gajzer, G. Mosoyan, F. Feller, J. Mascarenhas, R. Hoffman, Panobinostat (LBH589)-induced acetylation of tubulin impairs megakaryocyte maturation and platelet formation, *Exp. Hematol.* 40 (2012) 564–574, <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2012.02.004>.
- [55] K. Messaoudi, A. Ali, R. Ishaq, A. Palazzo, D. Sliwa, O. Bluteau, S. Souquière, D. Müller, K.M. Diop, P. Rameau, V. Lapiere, J.P. Marolleau, P. Matthias, I. Godin, G. Pierron, S.G. Thomas, S.P. Watson, N. Droin, W. Vainchenker, I. Plo, H. Raslova, N. Debili, Critical role of the HDAC6-cortactin axis in human megakaryocyte maturation leading to a proplatelet-formation defect, *Nat. Commun.* 8 (2017) 1786, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01690-2>.
- [56] A.S. Ribba, M. Batzenschlager, C. Rabat, T. Buchou, S. Moog, S. Khochbin, E. Bourova-Flin, L. Lafanechère, F. Lanza, K. Sadoul, Marginal band microtubules are acetylated by α TAT1, *Platelets* 19 (2021) 568–572, <https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1759791>.
- [57] D. Portran, L. Schaedel, Z. Xu, M. Théry, M.V. Nachury, Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing, *Nat. Cell Biol.* 19 (2017) 391–398, <https://doi.org/10.1038/ncb3481>.
- [58] L. Eshun-Wilson, R. Zhang, D. Portran, M.V. Nachury, D.B. Toso, T. Löhr, M. Vendruscolo, M. Bonomi, J.S. Fraser, E. Nogales, Effects of α -tubulin acetylation on microtubule structure and stability, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116 (2019) 10366–10371, <https://doi.org/10.1073/pnas.1900441116>.
- [59] S.J. Morley, Y. Qi, L. Iovino, L. Andolfi, D. Guo, N. Kalebic, L. Castaldi, C. Tischer, C. Portulano, G. Bolasco, K. Shirlekar, C.M. Fusco, A. Asaro, F. Fermani, M. Sundukova, U. Matti, L. Reymond, A. De Ninno, L. Businaro, K. Johansson, M. Lazzarino, J. Ries, Y. Schwab, J. Hu, P.A. Heppenstall, Acetylated tubulin is essential for touch sensation in mice, *Elife* 5 (2016) e20813, <https://doi.org/10.7554/eLife.20813>.
- [60] B. Ye, C. Li, Z. Yang, Y. Wang, J. Hao, L. Wang, Y. Li, Y. Du, L. Hao, B. Liu, S. Wang, P. Xia, G. Huang, L. Sun, Y. Tian, Z. Fan, Cytosolic carboxypeptidase CCP6 is required for megakaryopoiesis by modulating Mad2 polyglutamylation, *J. Exp. Med.* 211 (2014) 2439–2454, <https://doi.org/10.1084/jem.20141123>.
- [61] J.J. Skinner, S. Wood, J. Shorter, S.W. Emlender, B.E. Black, The Mad2 partial unfolding model: regulating mitosis through Mad2 conformational switching, *J. Cell Biol.* 183 (2008) 761–768, <https://doi.org/10.1083/jcb.200808122>.
- [62] K. Rogowski, J. van Dijk, M.M. Magiera, C. Bosc, J.C. Deloulme, A. Bosson, L. Peris, N.D. Gold, B. Lacroix, M.B. Grau, N. Bec, C. Larroque, S. Desagher, M. Holzer, A. Andrieux, M.J. Moutin, C. Janke, A family of protein-deglutamylation enzymes associated with neurodegeneration, *Cell* 143 (2010) 564–578, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.014>.
- [63] S. Dunn, E.E. Morisson, T.B. Liverpool, C. Molina-París, R.A. Cross, M.C. Alonso, M. Peckham, Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells, *J. Cell Sci.* 121 (2008) 1085–1095, <https://doi.org/10.1242/jcs.026492>.
- [64] R.J. McKenney, W. Huynh, R.D. Vale, M. Sirajuddin, Tyrosination of α -tubulin controls the initiation of processive dynein-dynactin motility, *EMBO J.* 35 (2016) 1175–1185, <https://doi.org/10.15252/embo.201593071>.
- [65] J.J. Nirschl, M.M. Magiera, J.E. Lazarus, C. Janke, E.L.F. Holzbaur, α -Tubulin tyrosination and CLIP-170 phosphorylation regulate the initiation of dynein-driven transport in neurons, *Cell Rep.* 14 (2016) 2637–2652, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.046>.
- [66] C. Aillaud, C. Bosc, L. Peris, A. Bosson, P. Heemeryck, J. Van Dijk, J. Le Fricq, B. Boulan, F. Vossier, L.E. Sanman, S. Syed, N. Amara, Y. Couté, L. Lafanechère,

- E. Denarier, C. Delphin, L. Pelletier, S. Humbert, M. Bogoy, A. Andrieux, K. Rogowski, M.J. Moutin, Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCPs) that regulate neuron differentiation, *Science* 358 (2017) 1448–1453, <https://doi.org/10.1126/science.aao4165>.
- [67] J. Nieuwenhuis, A. Adamopoulos, O.B. Bleijerveld, A. Mazouzi, E. Stickle, P. Celie, M. Altaalar, P. Knipscheer, A. Perrakis, V.A. Blomen, T.R. Brummelkamp, Vasohibins encode tubulin deacyrosinase activity, *Science* 358 (2017) 1453–1456, <https://doi.org/10.1126/science.aao5676>.
- [68] A.T. Pagnamenta, P. Heemeryck, H.C. Martin, C. Bosc, L. Peris, I. Uszynski, S. Gory-Fauré, S. Couly, C. Deshpande, A. Siddiqui, A.A. Elmonairi, S. Jayawant, S. Murthy, I. Walker, L. Loong, P. Bauer, F. Vossier, E. Denarier, T. Maurice, E. L. Barbier, J.C. Deloulme, J.C. Taylor, E.M. Blair, A. Andrieux, M.J. Moutin, Defective tubulin deacyrosinase causes structural brain abnormalities with cognitive deficiency in humans and mice, *Hum. Mol. Genet.* 28 (2019) 3391–3405, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz186>.
- [69] C. Erck, L. Peris, A. Andrieux, C. Meissirel, A.D. Gruber, M. Vernet, A. Schweitzer, Y. Saoudi, H. Pointu, C. Bosc, P.A. Salin, D. Job, J. Wehland, A vital role of tubulin-tyrosinase-ligase for neuronal organization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 7853–7858, <https://doi.org/10.1073/pnas.0409626102>.
- [70] A.O. Khan, A. Slater, A. MacLachlan, P.L.R. Nicolson, J.A. Pike, J.S. Reyat, J. Yule, R. Stapley, J. Rayes, S.G. Thong, N.V. Morgan, Post-translational polymodification of β 1-tubulin regulates motor protein localisation in platelet production and function, *Haematologica* 107 (2022) 243–259, <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.270793>. Online ahe.
- [71] S. Berry, D.D. Dawicki, M. Steiner, Time resolved analysis of tubulin phosphorylation during platelet activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159 (1989) 170–176, [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)92419-4](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)92419-4).
- [72] A. Janiak, R. Villar, R. Cassoly, F. Rendu, Tubulin is not phosphorylated in resting and thrombin-activated platelets, *J. Biochem.* 117 (1995) 296–302, <https://doi.org/10.1093/jb/117.2.296>.
- [73] J.M. Caron, Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: I. In vivo and cell-free studies, *Mol. Biol. Cell* 8 (1997) 621–636, <https://doi.org/10.1091/mbc.8.4.621>.
- [74] J. Wolff, Plasma membrane tubulin, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1788 (2009) 1415–1433, <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2009.03.013>.
- [75] J.L. Richardson, R.A. Shivdasani, C. Boers, J.H. Hartwig, J.E. Italiano, Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production, *Blood* 106 (2005) 4066–4075, <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2206>.
- [76] F. Adam, A. Kauskot, M. Kurowska, N. Goudin, I. Munoz, J.C. Bordet, J.D. Huang, M. Bryckaert, A. Fischer, D. Borge, G. De Saint Basile, O.D. Christophe, G. Ménasché, Kinesin-1 is a new actor involved in platelet secretion and thrombus stability, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38 (2018) 1037–1051, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.310373>.
- [77] B. Diagouraga, A. Grichine, A. Fertin, J. Wang, S. Khochbin, K. Sadoul, Motor-driven marginal band coiling promotes cell shape change during platelet activation, *J. Cell Biol.* 204 (2014) 177–185, <https://doi.org/10.1083/jcb.201306085>.
- [78] F. Gittes, E. Meyhöfer, S. Baek, J. Howard, Directional loading of the kinesin motor molecule as it buckles a microtubule, *Biophys. J.* 70 (1996) 418–429, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79585-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79585-1).
- [79] A. Mitra, L. Meißner, R. Gandhimathi, R. Renger, F. Ruhnow, S. Diez, Kinesin-14 motors drive a right-handed helical motion of antiparallel microtubules around each other, *Nat. Commun.* 11 (2020) 1–11, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16328-z>.
- [80] H. Schulze, M. Dose, M. Korpál, I. Meyer, J.E. Italiano, R.A. Shivdasani, RanBP10 is a cytoplasmic guanine nucleotide exchange factor that modulates noncentrosomal microtubules, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 14109–14119, <https://doi.org/10.1074/jbc.M709397200>.
- [81] S. Kunert, I. Meyer, S. Fleischhauer, M. Wannack, J. Fiedler, R.A. Shivdasani, H. Schulze, The microtubule modulator RanBP10 plays a critical role in regulation of platelet discoid shape and degranulation, *Blood* 114 (2009) 5532–5540, <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-216804>.
- [82] A. Wilde, S.B. Lizarraga, L. Zhang, C. Wiese, N.R. Gliksmán, C.E. Walczak, Y. Zheng, Ran stimulates spindle assembly by altering microtubule dynamics and the balance of motor activities, *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 221–227, <https://doi.org/10.1038/35060000>.
- [83] C. Iancu-Rubin, D. Gajzer, J. Tripodi, V. Najfeld, R.E. Gordon, R. Hoffman, G. F. Atweh, Down-regulation of stathmin expression is required for megakaryocyte maturation and platelet production, *Blood* 117 (2011) 4580–4589, <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-305540>.
- [84] C.A. Ramlogan-Steel, J.C. Steel, H. Fathallah, C. Iancu-Rubin, G.F. Atweh, Stathmin 1 deficiency induces erythro-megakaryocytic defects leading to macrocytic anemia and thrombocytopenia in Stathmin 1 knock out mice, *Blood Cells, Mol. Dis.* 87 (2021), 102522, <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2020.102522>.
- [85] S.A. Purro, L. Ciani, M. Hoyos-Flight, E. Stamatakou, E. Siomou, P.C. Salinas, Wnt regulates axon behavior through changes in microtubule growth directionality: a new role for adenomatous polyposis coli, *J. Neurosci.* 28 (2008) 8644–8654, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2320-08.2008>.
- [86] C. Strassel, S. Moog, L. Mallo, A. Eckly, M. Freund, C. Gachet, F. Lanza, Microtubule plus-end tracking Adenopolyposis Coli negatively regulates proplatelet formation, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–10, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34118-y>.
- [87] J. Pan, L. Lordier, D. Meyran, P. Rameau, Y. Lecluse, S. Kitchen-Goosen, I. Badriou, H. Mokrani, S. Narumiya, A.S. Alberts, W. Vainchenker, Y. Chang, The formin DIAPH1 (mDia1) regulates megakaryocyte proplatelet formation by remodeling the actin and microtubule cytoskeletons, *Blood* 124 (2014) 3967–3977, <https://doi.org/10.1182/blood-2013-12-544924>.
- [88] S. Stritt, P. Nurden, E. Turro, D. Greene, S.B. Jansen, S.K. Westbury, R. Petersen, W.J. Astle, S. Marlin, T.K. Bariana, M. Kostadima, C. Lentaing, S. Maiwald, S. Papadia, A.M. Kelly, J.C. Stephens, C.J. Penkett, S. Ashford, S. Tuna, S. Austin, T. Bakchoul, P. Collins, R. Favier, M.P. Lambert, M. Mathias, C.M. Millar, R. Mapeta, D.J. Perry, S. Schulman, I. Simeoni, C. Thys, K. Gomez, W.N. Erber, K. Stirrups, A. Rendon, J.R. Bradley, C. Van Geet, F.L. Raymond, M.A. Laffan, A. T. Nurden, B. Nieswandt, S. Richardson, K. Freson, W.H. Ouwehand, A. D. Mumford, A gain-of-function variant in DIAPH1 causes dominant macrothrombocytopenia and hearing loss, *Blood* 127 (2016) 2903–2914, <https://doi.org/10.1182/blood-2015-10-675629>.
- [89] A.D. DeWard, A.S.S. Alberts, Microtubule stabilization: formins assert their independence, *Curr. Biol.* 18 (2008) R605–R608, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.06.001>.
- [90] M. Zuidschewoude, E.J. Haining, V.A. Simms, S. Watson, B. Grygelska, A. T. Hardy, A. Bacon, S.P. Watson, S.G. Thomas, Loss of mDia1 and Fhlod1 impacts platelet formation but not platelet function, *Platelets* 17 (2021) 1051–1062, <https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1822522>.
- [91] C.L. Sayas, S. Basu, M. van der Reijden, E. Bustos-Morán, M. Liz, M. Sousa, W.F. J. van IJcken, J. Avila, N. Galjart, Distinct functions for mammalian CLASP1 and -2 during neurite and axon elongation, *Front. Cell. Neurosci.* 13 (2019) 1–17, <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00005>.
- [92] K. Drabek, L. Gutiérrez, M. Vermeij, T. Clapes, S.R. Patel, J.C. Boisset, J. van Haren, A.L. Pereira, Z. Liu, U. Akinç, T. Nikolic, W. van IJcken, M. van den Hout, M. Meinders, C. Melo, C. Sambade, D. Drabek, R.W. Hendriks, S. Philippen, M. Mommaas, F. Grosveld, H. Maiato, J.E. Italiano, C. Robin, N. Galjart, The microtubule plus-end tracking protein CLASP2 is required for hematopoiesis and hematopoietic stem cell maintenance, *Cell Rep.* 2 (2012) 781–788, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.040>.
- [93] A. Akhmanova, C.C. Hoogenraad, K. Drabek, T. Stepanova, B. Dordland, T. Verkerk, W. Vermeulen, B.M. Burgering, C.I. De Zeeuw, F. Grosveld, N. Galjart, CLASPs Are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts, *Cell* 104 (2001) 923–935, [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00288-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00288-4).
- [94] A. Aher, D. Rai, L. Schaedel, J. Gaillard, K. John, Q. Liu, M. Altaalar, L. Blanchoin, M. Thery, A. Akhmanova, CLASP mediates microtubule repair by restricting lattice damage and regulating tubulin incorporation, *Curr. Biol.* 30 (2020) 2175–2183.e6, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.070>.
- [95] M. Krendel, F.T. Zenke, G.M. Bokoch, Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton, *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) 294–301, <https://doi.org/10.1038/ncb773>.
- [96] Y. Gao, E. Smith, E. Ker, P. Campbell, E. chun Cheng, S. Zou, S. Lin, L. Wang, S. Halene, D.S. Krause, Role of rhoA-specific guanine exchange factors in regulation of endomitosis in megakaryocytes, *Dev. Cell.* 22 (2012) 573–584, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.12.019>.
- [97] Z. Ma, X. Wang, S. Hockman, E.C. Snow, L.B. Hersh, Subcellular localization of nardilysin during mouse oocyte maturation, *Arch. Biochem. Biophys.* 434 (2005) 187–194, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.10.027>.
- [98] V. Chesneau, A. Prat, D. Segretain, V. Hospital, A. Dupaix, T. Foulon, B. Jégou, P. Cohen, NRD convertase: a putative processing endoprotease associated with the axoneme and the manchette in late spermatids, *J. Cell Sci.* 109 (1996) 2737–2745.
- [99] Y. Ito, 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. ichi Harimoto, M. Nakagawa, T. Yamamoto, M. Handa, N. Watanabe, E. Nishi, F. Arai, S. Nishimura, K. Eto, Turbulence activates platelet biogenesis to enable clinical scale ex vivo production, *Cell* 174 (2018) 636–648.e18, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.011>.
- [100] L. Hu, Y. Xiao, Z. Xiong, F. Zhao, C. Yin, Y. Zhang, P. Su, D. Li, Z. Chen, X. Ma, G. Zhang, A. Qian, MACF1, versatility in tissue-specific function and in human disease, *Semin. Cell Dev. Biol.* 69 (2017) 3–8, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.017>.
- [101] Y. Schurr, M. Spindler, H. Kurz, M. Bender, The cytoskeletal crosslinking protein MACF1 is dispensable for thrombus formation and hemostasis, *Sci. Rep.* 9 (2019) 7726, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44183-6>.
- [102] A. Jurak Begonja, K.M. Hoffmeister, J.H. Hartwig, H. Falet, FlnA-null megakaryocytes prematurely release large and fragile platelets that circulate poorly, *Blood* 118 (2011) 2285–2295, <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-348482>.
- [103] M. Bender, S. Stritt, P. Nurden, J.M.M. van Eeuwijk, B. Zieger, K. Kentouche, H. Falet, H. Morbach, D. Stegner, K.G. Heinze, S. Dütting, S. Gupta, W. Witke, H. Falet, A. Fischer, J.H. Hartwig, B. Nieswandt, Megakaryocyte-specific profilin1-deficiency alters microtubule stability and causes a Wiskott-Aldrich syndrome-like platelet defect, *Nat. Commun.* 5 (2014) 4746, <https://doi.org/10.1038/ncomms5746>.
- [104] J.L. Henty-Ridilla, M.A. Juanes, B.L. Goode, Profilin directly promotes microtubule growth through residues mutated in amyotrophic lateral sclerosis, *Curr. Biol.* 27 (2017) 3535–3543.e4, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.10.002>.
- [105] S. Chakraborti, K. Natarajan, J. Curjel, C. Janke, J. Liu, The emerging role of the tubulin code: from the tubulin molecule to neuronal function and disease, *Cytoskeleton* 73 (2016) 521–550, <https://doi.org/10.1002/cm.21290>.
- [106] K. Freson, R. De Vos, C. Wittevrongel, C. Thys, J. Defoor, L. Vanhees, J. Vermeylen, K. Peerlinck, C. Van Geet, The TUBB1 Q43P functional polymorphism reduces the

- risk of cardiovascular disease in men by modulating platelet function and structure, *Blood* 106 (2005) 2356–2362, <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0723>.
- [107] Z.I.O. Çalişkaner, A.A. Waheed, M.T. Öztürk, Y. Oymak, U.H. Tazebay, M.N. Akar, A. Kandilci, Dided Özkan, Identification of novel TUBB1 variants in patients with macrothrombocytopenia, *Turk. J. Med. Sci.* 51 (2021) 490–500.
- [108] T. Matsumura, A. Nakamura-Ishizu, K. Takaoka, H. Maki, S.S.N.A. Muddineni, C. Q. Wang, H. Suzushima, M. Kawakita, N. Asou, M. Matsuoka, M. Kurokawa, M. Osato, T. Suda, TUBB1 dysfunction in inherited thrombocytopenia causes genome instability, *Br. J. Haematol.* 185 (2019) 888–902, <https://doi.org/10.1111/bjh.15835>.
- [109] S. Kunishima, S. Nishimura, H. Suzuki, M. Imaizumi, H. Saito, TUBB1 mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia, *Eur. J. Haematol.* 92 (2014) 276–282, <https://doi.org/10.1111/ejh.12252>.
- [110] V. Palma-Barqueros, L. Bury, S. Kunishima, M.L. Lozano, A. Rodriguez Alen, N. Revilla, N. Bohdan, J. Padilla, M.P. Fernandez-Perez, M.E. de la Morena-Barrio, A. Marin-Quilez, R. Benito, M.F. López-Fernández, S. Marcellini-Antonio, A. Zamora-Cánovas, V. Vicente, C. Martínez, P. Gresele, J.M. Bastida, J. Rivera, Expanding the genetic spectrum of TUBB1-related thrombocytopenia, *Blood Adv.* 5 (2021) 5453–5467, <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020004057>.
- [111] S.C. Ti, G.M. Alushin, T.M. Kapoor, Human β -tubulin isotypes can regulate microtubule protofilament number and stability, *Dev. Cell* 47 (2018) 175–190.e5, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.08.014>.
- [112] P. Guéguen, A. Dupuis, J.Y. Py, A. Desprès, E. Masson, C. Le Marechal, D. N. Cooper, C. Gachet, J.M. Chen, C. Férec, Pathogenic and likely pathogenic variants in at least five genes account for approximately 3% of mild isolated nonsyndromic thrombocytopenia, *Transfusion* 60 (2020) 2419–2431, <https://doi.org/10.1111/trf.15992>.
- [113] K. Burley, S.K. Westbury, A.D. Mumford, TUBB1 variants and human platelet traits, *Platelets* 29 (2018) 209–211, <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1411587>.
- [114] B. Saposnik, M. Simansour, M. Hurtaud-Roux, V. Latger-Cannard, P. Nurden, T. Lecompte, N. Schlegel, Identification of three novel mutations in TUBB1 gene with macrothrombocytopenia[poster], *J. Thromb. Haemost.* 11 (2013) 404–405.
- [115] B. Guillet, S. Bayart, X. Pillois, P. Nurden, J.P. Caen, A.T. Nurden, A Glanzmann thrombasthenia family associated with a TUBB1-related macrothrombocytopenia, *J. Thromb. Haemost.* 17 (2019) 2211–2215, <https://doi.org/10.1111/jth.14622>.
- [116] B. Johnson, G.C. Lowe, J. Futterer, M. Lordkipanidzé, D. Macdonald, M. A. Simpson, I. Sanchez-Guiú, S. Drake, D. Bem, V. Leo, S.J. Fletcher, B. Dawood, J. Rivera, D. Allsup, T. Biss, P.H. Bolton-Maggs, P. Collins, N. Curry, C. Grimley, B. James, M. Makris, J. Motwani, S. Pavord, K. Talks, J. Thachil, J. Wilde, M. Williams, P. Harrison, P. Gissen, S. Mundell, A. Mumford, M.E. Daly, S. P. Watson, N.V. Morgan, Whole exome sequencing identifies genetic variants in inherited thrombocytopenia with secondary qualitative function defects, *Haematologica* 101 (2016) 1170–1179, <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.146316>.
- [117] L.J. Leandro-García, S. Leskelä, L. Inglada-Pérez, I. Landa, A.A. De Cubas, A. Maliszewska, I. Comino-Méndez, R. Letón, Á. Gómez-Graña, R. Torres, J. C. Ramírez, S. Álvarez, J. Rivera, C. Martínez, M.L. Lozano, A. Cascón, M. Robledo, C. Rodríguez-Antona, Hematologic β -tubulin VI isoform exhibits genetic variability that influences paclitaxel toxicity, *Cancer Res.* 72 (2012) 4744–4752, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2861>.

Annexe 3

*Article : Isolation of mouse
megakaryocyte progenitors*

Isolation of Mouse Megakaryocyte Progenitors

Quentin Kimmerlin¹, Manuela Tavian², Christian Gachet¹, François Lanza¹, Nathalie Brouard¹

¹ Université de Strasbourg, INSERM UMR S1255, EFS Grand-EST ² UMR-S1113 –IRFAC, Université de Strasbourg

Corresponding Author

Nathalie Brouard

nathalie.brouard@efs.sante.fr

Citation

Kimmerlin, Q., Tavian, M., Gachet, C., Lanza, F., Brouard, N. Isolation of Mouse Megakaryocyte Progenitors. *J. Vis. Exp.* (171), e62498, doi:10.3791/62498 (2021).

Date Published

May 20, 2021

DOI

10.3791/62498

URL

jove.com/video/62498

Abstract

Bone marrow megakaryocytes are large polyploid cells that ensure the production of blood platelets. They arise from hematopoietic stem cells through megakaryopoiesis. The final stages of this process are complex and classically involve the bipotent Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitors (MEP) and the unipotent Megakaryocyte Progenitors (MKp). These populations precede the formation of *bona fide* megakaryocytes and, as such, their isolation and characterization could allow for the robust and unbiased analysis of megakaryocyte formation. This protocol presents in detail the procedure to collect hematopoietic cells from mouse bone marrow, the enrichment of hematopoietic progenitors through magnetic depletion and finally a cell sorting strategy that yield highly purified MEP and MKp populations. First, bone marrow cells are collected from the femur, the tibia, and also the iliac crest, a bone that contains a high number of hematopoietic progenitors. The use of iliac crest bones drastically increases the total cell number obtained per mouse and thus contributes to a more ethical use of animals. A magnetic lineage depletion was optimized using 450 nm magnetic beads allowing a very efficient cell sorting by flow cytometry. Finally, the protocol presents the labeling and gating strategy for the sorting of the two highly purified megakaryocyte progenitor populations: MEP (Lin⁻ Sca-1⁻ c-Kit⁺ CD16/32⁻ CD150⁺ CD9^{dim}) and MKp (Lin⁻ Sca-1⁻ c-Kit⁺ CD16/32⁻ CD150⁺ CD9^{bright}). This technique is easy to implement and provides enough cellular material to perform i) molecular characterization for a deeper knowledge of their identity and biology, ii) *in vitro* differentiation assays, that will provide a better understanding of the mechanisms of maturation of megakaryocytes, or iii) *in vitro* models of interaction with their microenvironment.

Introduction

Blood platelets are produced by megakaryocytes. These large polyploid cells are located in the bone marrow and as for all blood cells they are derived from Hematopoietic Stem Cells (HSC)¹. The classical pathway of production of

megakaryocytes in the bone marrow originates from HSC and involves the generation of different progenitors that progressively restrict their differentiation potential². The first progenitor signing the commitment to the megakaryocytic lineage is the Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor (MEP), a bipotent progenitor capable of producing both erythroid cells and megakaryocytes^{3,4,5}. The MEP then produces a unipotent progenitor/precursor (MKp) that will differentiate into a mature megakaryocyte capable of producing platelets. The mechanisms involved in the generation of these progenitors, as well as their differentiation and maturation into megakaryocytes are complex and only partially understood. In addition, the heterogeneity of the MEP population in terms of differentiation potential and the intrinsic commitment level of these cells are still unclear. To decipher these processes, it is essential to obtain (or have access to) purified populations of MEP and MKp for fine molecular and single cell analyses.

Several studies have demonstrated particular combinations of cell surface markers for the identification of progenitors committed to the megakaryocytic lineage in the mouse^{6,7,8}. From these a method was devised allowing the purification of MEP and MKp from mice. This method was optimized to obtain cells in adequate number and quality for a large number of assays. With ethical considerations in mind, and in order to minimize the number of animals involved in the experiments, we elicited to harvest the bone marrow from the femur and tibia, and also from the iliac crest. This bone contains a high frequency and number of hematopoietic progenitors and is most of the time damaged during long bone harvesting. Presented here is a detailed method for the reliable collection of this bone.

The second criteria of optimization is to produce highly purified cell populations. Fluorescent Activated Cell Sorting

(FACS) is a method of choice in order to obtain purified populations of cells of interest. However, low yields are reached when the cell population of interest is very rare. Enrichment procedures are thus necessary. In this protocol, a negative selection procedure was opted using magnetic beads.

Protocol

Protocols involving animals were performed in accordance with the CREMEAS Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Strasbourg (Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale Strasbourg. Permit Number: E67-482-10).

1. Mouse bone collection

1. Sacrifice the animal in compliance with the institutional guidelines.

NOTE: The data presented in this manuscript were obtained from C57Bl/6 mice of 8 to 12 weeks old. The number of cells obtained, and the frequency of cited populations may vary with age and mouse strain.

2. Spray the body with 70% ethanol.
3. Using scissors, make a 0.5-1 cm incision of the skin perpendicular to the spine and tear the skin around the whole body. Pull down the skin from the lower body and remove the skin.
4. Place the animal on the dissection pad, face down. Locate the pelvic bones by sliding your fingers along the exposed spine from the top to the bottom. To locate the iliac crest, identify the small bump in the lumbar region near the hindlimbs (the anterosuperior region of the pelvic bone). **Figure 1A,B** presents a schematic representation of the mouse anatomy.

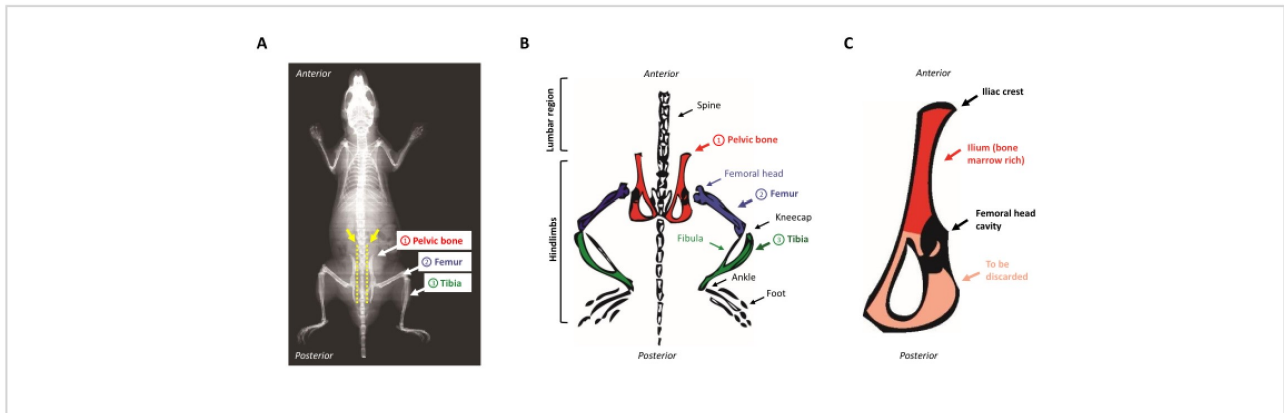


Figure 1: Mouse anatomy. (A) Mouse X-Ray showing the hindlimb bones. Note the space between the pelvic bone and the spine (yellow arrow), where the scissors must be inserted to properly separate the hindlimbs from the body of the mouse (yellow dotted line). (B) Schematic representation of the bone marrow-rich bones of interest. The pelvic bones are depicted in red, the femurs in purple, and the tibias in green. (C) Schematic representation of the mouse pelvic bone. The ilium corresponds to the marrow-rich part of the pelvic bone and is highlighted in red. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

5. Place the scissors parallel to the spine against the vertebrae and close to the iliac crest bump. Proceed to cut the muscles along the side of the spine above the pelvic bone by sliding the scissors along the vertebrae all the way down to the tail.
NOTE: This first section of muscles can also be performed using a scalpel blade.
6. Place the scissors parallel to the spine and proceed to cut between the vertebrae and the iliac crest, as indicated by the yellow dotted line on **Figure 1A**. Make sure to remain as close to the vertebrae as possible. Cut the remaining muscles to detach the limb from the body.
NOTE: There should be little to no resistance.
7. Repeat on the other side to detach the second limb.
8. Transfer the limbs on a clean surface and discard the rest of the body in compliance with the institutional guidelines.
9. Expose the pelvic, femoral, and tibial bones by removing as much surrounding tissue as possible with the forceps and the scalpels.
10. Proceed to carefully dislocate the femoral head from the pelvic bone by holding the distal end of the femur with the forceps while gently slicing the muscles around the articulation with the scalpels. Wiggle the bones to facilitate the dislocation.
11. Scrape off the remaining muscle from the pelvic bone and cut with a scalpel in the middle of the cavity that did hold the femur head. The ilium is kept as it is rich in hematopoietic progenitors while the triangular very thin side of the bone is discarded, as shown in **Figure 1C**.
12. Remove the residual tissues around the ilium with the scalpel and place the cleaned bone in sterile

PBS supplemented with 2% Newborn Calf Serum (PBS-2%NBCS).

13. Using scissors, cut off the foot from the leg at the ankle.
14. Hold the lower part of the tibia with the forceps and scrape the muscle up toward the knee. Discard the fibulae and cut across the tibial plateau with the scalpel. Place the tibia in sterile PBS-2%NBCS.
15. Remove the residual tissues around the femur with scalpels.
16. Hold the upper side of the femur with forceps; place the scalpel blade at the base of the kneecap. Apply a force toward the kneecap parallel to the femur until the detachment of the kneecap. Place the femur in sterile PBS-2%NBCS. Removal of the kneecap provides a clean access for inserting the needle for marrow flushing.

2. Magnetic depletion of lineage positive cells

1. In a laminar flow cabinet, transfer the bones in a sterile Petri dish filled with sterile PBS-2%NBCS.
2. With a scalpel cut off the head of the femurs.
3. Fill a 1 mL syringe with sterile PBS-2%NBCS and attach a 21 G needle to the outlet.
4. Fill a 5 mL polypropylene tube with 2 mL of sterile PBS-2%NBCS.
5. Hold the femur with the forceps; gently insert the needle in the groove left after the kneecap removal. Apply rotation to the needle while inserting to avoid plugging of the needle. Ensure that the needle is completely inserted into the bone up to the bevel.
6. Transfer the bone with the needle into the tube containing 2 mL of PBS-2%NBCS. Dispense and aspirate the PBS-2%NBCS from the syringe until the bone is clear.

7. Remove the needle from the femur and insert it in the hole at opposite side where the femur head was. Dispense and aspirate the buffer again and discard the bone.
8. For the iliac crest and tibia, hold the bone with the forceps; gently insert the needle in the open side. Apply rotation to the needle while inserting to avoid plugging of the needle. Ensure that the needle is completely inserted into the bone up to the bevel. Transfer the bone with the needle into the tube containing 2 mL of PBS-2%NBCS. Dispense and aspirate the PBS-2%NBCS from the syringe until the bone is clear. Discard the bones.
9. Pass the pooled cell suspension through a 40 μ m cell strainer cap placed onto a sterile 5 mL polystyrene tube.
10. Proceed to count the cells.

NOTE: Cell count can be performed with any hemocytometer, using Trypan Blue for viability assessment, or with any automated cell counter. One mouse typically yields $105 \pm 7 \times 10^6$ cells.

11. Take aside 100 μ L of the cell suspension as Total Bone Marrow, add 500 μ L of PBS-2%NBCS and save it on ice for the staining procedure.
12. Pellet the filtered suspension by centrifugation at 400 x g for 5 min at 4 °C and discard the supernatant.

NOTE: Red blood cells can be lysed by resuspending the pellet in freshly prepared Lysis Solution (1/10th in dH₂O). Incubate for 5 min until the suspension becomes clear and bright red and add 10 volumes of sterile PBS. Proceed to wash the cells in PBS-2%NBCS by centrifugation at 400 x g for 5 mins at 4 °C. Be careful when removing the supernatant as the cell pellet is very

loose. Perform a second wash with PBS-2%NBCS by centrifugation at 400 x g for 5 min at 4 °C and proceed to step 2.13.

13. Resuspend the cell pellet in freshly prepared primary antibody cocktail with a ratio of 100 µL per 1 x 10⁷ cells. Incubate on ice for 30-45 min.

Antibody	Dilution
Gr-1-biotin	1:500
B220-biotin	1:500
Mac-1-biotin	1:500
CD3-biotin	1:500
CD4-biotin	1:500
CD5-biotin	1:500
CD8-biotin	1:500
TER119-biotin	1:1000
CD127-biotin	1:500

Table 1.

14. Take aside 10 µL of the cell suspension into a sterile 5 mL polystyrene tube labeled Lin-Pos Fraction. Add 90 µL of PBS-2%NBCS and save it on ice for the staining procedure.
15. Proceed to wash the cells twice with sterile PBS-2%NBCS by centrifugation at 400 x g for 5 min at 4 °C. Make sure to do the last wash in a sterile 5 mL polypropylene tube.
16. During the washing steps, prepare the beads for the magnetic depletion.
 1. Resuspend the beads in the vial by thoroughly vortexing for 30 s.
 2. Transfer a volume of beads corresponding to two beads per target cell into a 5 mL polypropylene tube.
 3. Wash the beads twice with PBS-2%NBCS by placing the tube on the magnet and removing the washing buffer using a sterile glass Pasteur pipette.
 4. Resuspend the beads in 500 µL of sterile PBS-2NBCS%.
17. Resuspend the pellet of labeled cells in 250 µL of beads and mix gently for 5 min on ice. Add 2 mL of sterile PBS-2%NBCS and mix gently. Do not shake the tube.
18. Place the tube onto the magnet for 2 min.
19. Proceed to collect the non-magnetic fraction with a sterile glass Pasteur pipette and add it onto the remaining 250 µL of magnetic beads. Seal the tube with parafilm.
20. Place the tube on a tube roller for 20 min at 4 °C.

21. Add 2 mL of sterile PBS-2%NBCS and mix gently. Do not shake the tube.
 22. Place the tube in the magnet for 2 min.
 23. Proceed to collect the non-magnetic fraction into a sterile 5 mL polypropylene tube labeled Lin-Neg Fraction with a sterile glass Pasteur pipette.
 24. Pellet the cells by centrifugation at 400 x g for 5 min at 4 °C and remove the supernatant.
 25. Resuspend the non-magnetic cells in 500 µL of sterile PBS-2%NBCS.
 26. Proceed to count the cells.
- NOTE:** One mouse typically yields $3.9 \pm 1.1 \times 10^6$ cells. Typical lineage staining pre- and post- depletion are presented in **Figure 2B**.
- 3. Cell sorting of megakaryocyte progenitors by flow cytometry**
1. Take the tubes labeled Total Bone Marrow, Lin-Pos Fraction, and Lin-Neg Fraction.
 2. Proceed to split the content of the tube Total Bone Marrow equally into six sterile 5 mL polystyrene tubes. Label the tubes with the numbers 1-6.
 3. Proceed to label the tube Lin-Pos Fraction with the number 7.
 4. Proceed to split the content of the tube Lin-Neg Fraction as follows.
 1. Transfer 50 µL into a sterile 5 mL polystyrene tube containing 250 µL of sterile PBS-2%NBCS. Then, split its content equally into 3 sterile 5 mL polystyrene tubes. Label these tubes with the numbers 8-10.
 2. The remaining 450 µL of Lin-Neg Fraction cell suspension corresponds to the tube with the number 11.
 5. Add the antibodies to the tubes as described in **Table 2**.

1. Take the tubes labeled Total Bone Marrow, Lin-Pos Fraction, and Lin-Neg Fraction.

Tube	Label	Antibody cocktail
Total Bone Marrow		
1	Unstained control	
2	Single stained control	CD45-FITC (1/200)
3	Single stained control	CD45-PE (1/200)
4	Single stained control	TER119-APC (1/200)
5	Single stained control	CD45-PECy7 (1/200)
6	Single stained control	CD45-APC-Cy7 biotin (1/200)
Lin-Pos Fraction		
7	Single stained control	Single stained control. Streptavidin-APC-Cy7 (1/500)

Lin-Neg Fraction		
8	FMO FITC control	c-kit-APC (1/200) + Sca-1-PE (1/200) + CD16/32-PE (1/200) + CD150-PECy7 (1/200) + Streptavidin-APC-Cy7 (1/500)
9	FMO PE control	CD9-FITC (1/200) + c-kit-APC (1/200) + CD150-PECy7 (1/200) + Streptavidin-APC-Cy7 (1/500)
10	FMO PECy7 control	CD9-FITC (1/200) + c-kit-APC (1/200) + Sca-1-PE (1/200) + CD16/32-PE (1/200) + Streptavidin-APC-Cy7 (1/500)
11	Positive tube for sorting	CD9-FITC (1/200) + c-kit-APC (1/200) + Sca-1-PE (1/200) + CD16/32-PE (1/200) + CD150-PECy7 (1/200) + Streptavidin-APC-Cy7 (1/500)

Table 2.

6. Incubate on ice for 30-45 min in the dark.
7. Wash the cells with sterile PBS-2%NBSCS by centrifugation at 400 x g for 5 min at 4 °C.
8. Resuspend the cell pellets as follows.
 1. For the tubes 1 to 10, resuspend the pellet in 300 µL of sterile PBS-2%NBSCS supplemented with 7AAD (2.5 µg/mL final) (PBS-7AAD).
CAUTION: 7AAD is a DNA intercalant and must therefore be handled with appropriate PPE (gloves).
 2. For tube 11, resuspend the pellet in sterile PBS-7AAD at a maximum concentration of 5 x 10⁶ cells per mL and a minimum volume of 1 mL.
9. Prepare two polypropylene collection tubes labeled MEP and MKp containing 2 mL of PBS-2%NBSCS.

NOTE: Alternatively, cells can be collected into culture medium or cell lysis buffer depending on the subsequent application for the sorted cells. The use of polystyrene tubes is not recommended because of possible interference with the charged droplets containing the cells of interest.

10. Keep all tubes on ice in the dark.
11. Proceed to the cell sorter set-up.
 1. Use the tubes 1-7 to set-up voltage and compensation, tubes 7-10 to determine the sorting gates for the cell populations of interest and tube 11 for cell sorting.
12. The first steps of the gating strategy aim to exclude doublets and dead cells from the analysis, as described in **Figure 3**. Identify single viable cells and display SSC-

vs Lin-APC-Cy7 dot plot to confirm the efficiency of the lineage depletion. From the Lin⁻ cells a gate is set to select cells positive for c-kit and negative or dim for Sca-1 and CD16/32. A CD9 vs CD150 expression dot plot for the selected cells allows the identification of four populations.

NOTE: MEP and MKp cells are both positive for CD150. Three levels of expression for CD9 can be defined (neg, dim, and high). MKp express high level of CD9 and MEP express CD9 at an intermediate fluorescence intensity level. MEP population corresponds to Lin⁻ c-Kit⁺ Sca-1-CD16/32^{-dim} CD150⁺ CD9^{dim} and MKp population corresponds to Lin⁻ c-Kit⁺ Sca-1-CD16/32^{-dim} CD150⁺ CD9^{bright}. The discrimination between CD9 high and CD9 dim populations for the CD150 positive cells is set based on the maximum level of CD9 expression in the CD150 negative population. One mouse typically yields $5.3 \pm 0.6 \times 10^3$ MKp and $27.2 \pm 2.4 \times 10^3$ MEP.

Representative Results

Phenotypic analysis of the cells identified as MEP and MKp were performed by flow cytometry. Cells were labeled with fluorescence conjugated antibodies to CD41a and CD42c, classical markers of the megakaryocytic and platelet lineages. Both markers were expressed by the cells of the MKp population while these markers are not yet detected at the surface of the cells of the MEP population (**Figure 4Ai,4Aii**). Polyploidy is a hallmark of megakaryocytes. The DNA content of the sorted populations was also analyzed and demonstrated that the cells are mostly 2N for the MEP population and a small proportion of the MKp cells are 4N, but higher ploidy are not significantly detected in these populations (**Figure 4Aiii**).

In order to confirm the identity of the sorted cell populations, several differentiation assays were performed to evaluate their capacity to differentiate toward the megakaryocytic and erythroid lineages. First, semi-solid clonogenic assays were performed to quantify megakaryocytic progenitor (CFU-MK) and erythroid progenitors (BFU-E). CFU-MK were detected in both MEP and MKp populations but not in the other population tested (**Figure 4B**). BFU-E were not detected in the MKp population but were detected in MEP population and the CD150⁻CD9^{dim} cell population (**Figure 4C**).

The differentiation of the sorted cells was also followed in liquid culture in the presence of a low concentration of hematopoietic cytokines. Representative images from microscopic observation on the 3rd day of differentiation show that MEP and MKp produced mainly megakaryocytes that are identified as large cells (**Figure 5Aiii,5Aiv**). Megakaryocytes were identified using CD41 and CD42c expression and represent $53.9 \pm 10.4\%$ and $82.0 \pm 2.0\%$ of the cells produced from MEP and MKp cell populations, respectively (**Figure 5B**). Noticeably, the ploidy of the megakaryocytes produced analyzed using DNA marker Hoescht 33242, was greater for the megakaryocyte derived from MKp population compared to the MEP population suggesting a more mature state (**Figure 5C**). Finally, the cells produced from each population on the 3rd day were subjected to a proplatelet formation assay⁹. It was observed that only the cells derived from the MKp population were capable of proplatelet emission in this condition (**Figure 5D**). This suggests a more advanced maturation stage for the MKp population. Furthermore, when culture duration is extended up to 4-5 days, megakaryocytes generated from MEP will also extend proplatelets.

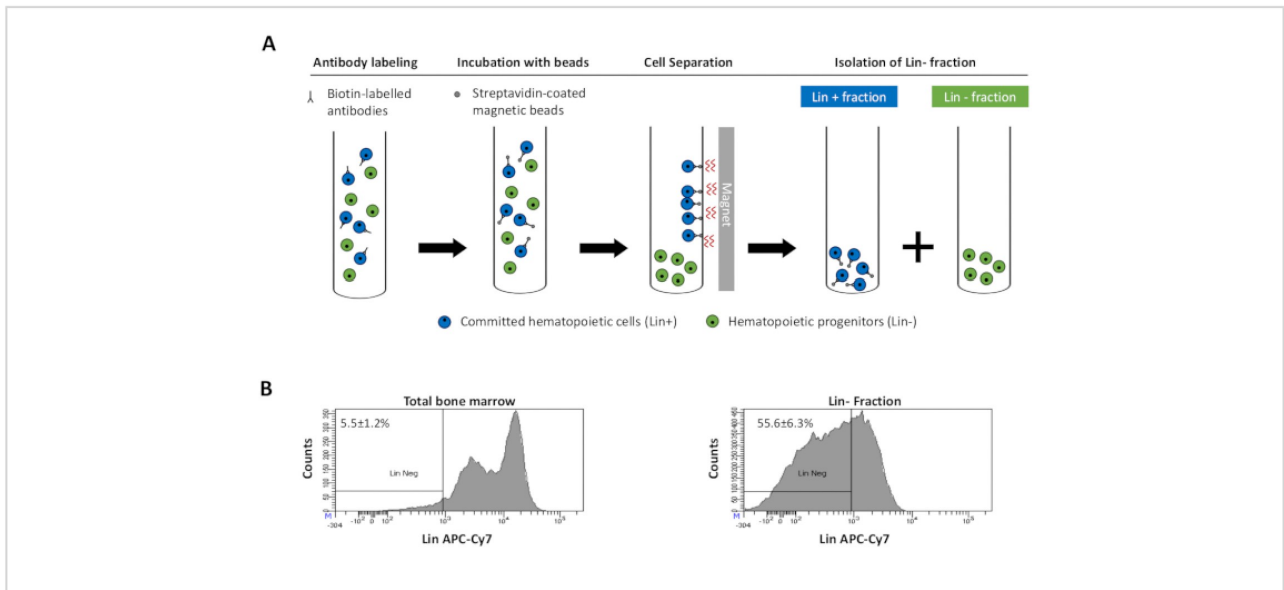


Figure 2: Magnetic depletion of lineage committed (Lin) cells. (A) Schematic representation of the magnetic depletion protocol. First, unsorted bone marrow cells are labeled with the biotin-conjugated rat anti-mouse antibody cocktail. Cells are then incubated with anti-rat Ig coated magnetic beads and subsequently subjected to the magnetic depletion using a strong magnet. The magnet will retain the labeled magnetic Lin+ fraction against the tube walls, while the unlabeled non-magnetic Lin- negative fraction will be collected in a new tube. (B) Lineage committed cells can be identified using fluorescent conjugated streptavidin. Typical analysis of the lineage expression in cells prior to magnetic depletion (total bone marrow) and after magnetic depletion (Lin- Fraction) N = 21. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

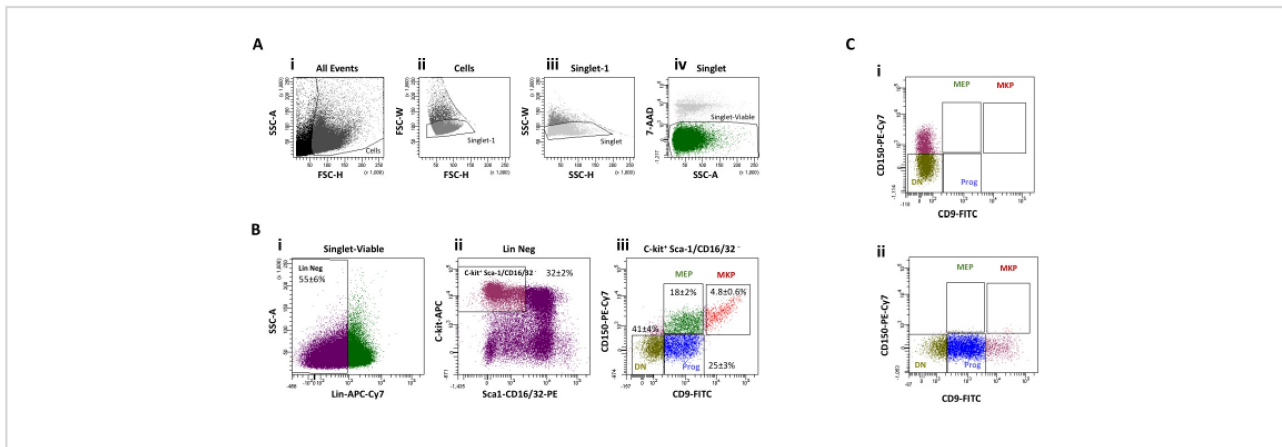


Figure 3: Cell sorting gating strategy. (A) Selection of the events corresponding to viable single cells. (B) MEP and MKp population selection. (i) The Lin Neg population is selected from the viable single cell events. (ii) Progenitors expressing c-kit and with low to no expression of Sca-1 or CD16/32 antigen are then selected. (iii) CD9 and CD150 expression levels define four cell populations. MKp are defined as CD9^{bright}CD150⁺ cells, MEP are defined as CD9^{dim}CD150⁺. The higher limit for the CD9 expression for the CD9^{dim}CD150⁺ population is based on the maximum CD9 expression level for the CD150⁻ cells. For the purpose of analysis, CD9^{dim}CD150⁻ cells (Progenitors) and CD9⁻CD150⁻ (Double Negative: DN) were also sorted. (C) Cell sorting gates are based on Fluorescence Minus One (FMO) controls. (i) FMO control for CD9 gates (ii) FMO control for CD150 gates. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

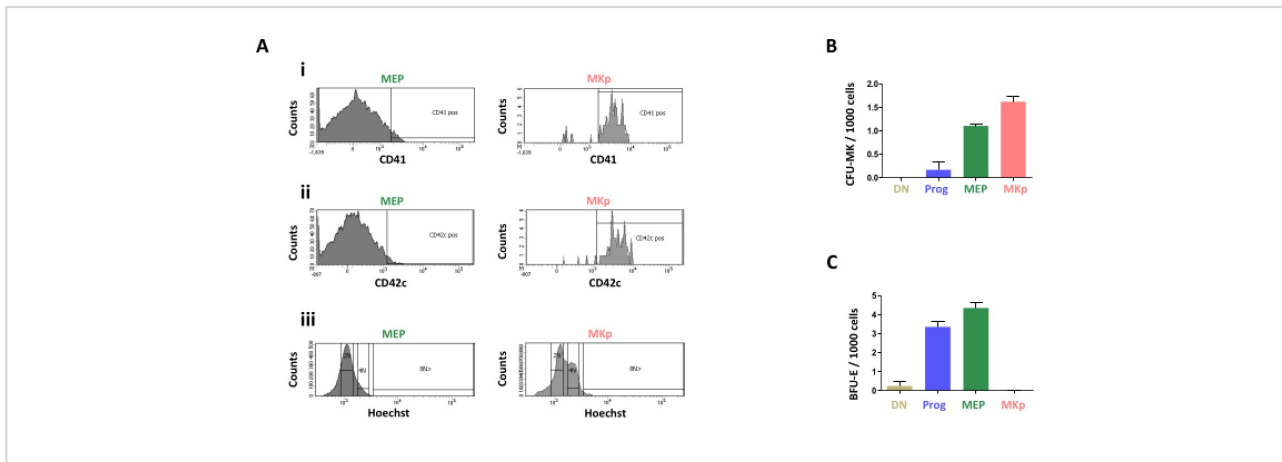


Figure 4: Characterization of the MEP and MKp cell populations. (A) Flow cytometry analysis of (i) CD41 expression, (ii) CD42c expression and (iii) DNA content (Hoechst33342) in the CD9⁺CD150^{dim} (MEP) and CD9⁺CD150^{bright} (MKp) cell populations. (B) Quantification of CFU-MK from the sorted cell populations. CD9⁻CD150⁻ (DN), CD9⁺CD150⁻ (Prog), CD9⁺CD150^{dim} (MEP), and CD9⁺CD150^{bright} (MKp) cell populations were sorted and plated in collagen gel according to the manufacturer's instructions. (C) Quantification of BFU-E from the sorted cell populations. CD9⁻CD150⁻ (DN), CD9⁺CD150⁻ (Prog), CD9⁺CD150^{dim} (MEP), and CD9⁺CD150^{bright} (MKp) cell populations were sorted and plated in methyl cellulose gel according to the manufacturer's instructions. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

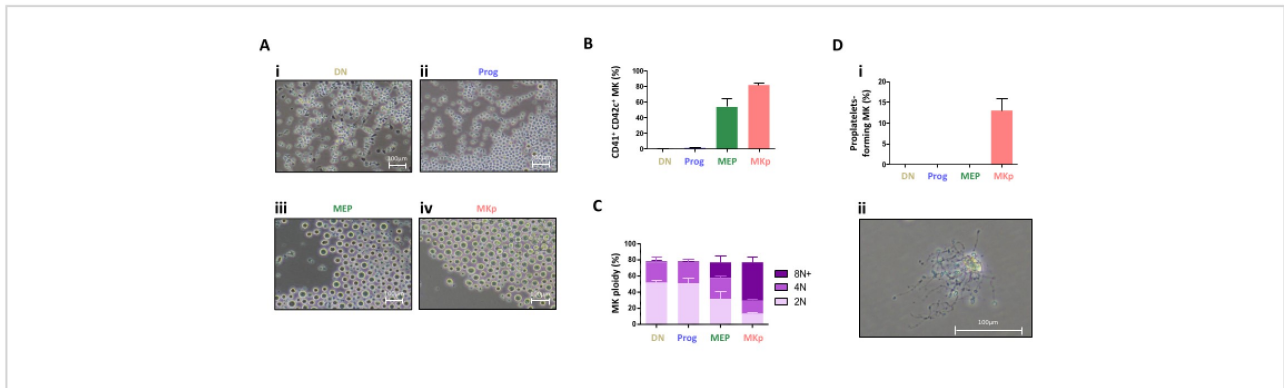


Figure 5: Differentiation potential of MEP and MKp. CD9⁻CD150⁻ (DN), CD9⁺CD150⁻ (Prog), CD9⁺CD150^{dim} (MEP), and CD9⁺CD150^{bright} (MKp) cell populations were cultured for three days in StemSpan medium supplemented with SCF (7.5 ng/mL), Flt-3 (5 ng/mL), IL-6 (1 ng/mL), and TPO (10 ng/mL). (A) Representative images were taken by phase-contrast microscopy. (B) The percentage of CD41⁺CD42c⁺ megakaryocytes was then assessed by flow cytometry. N = 3. (C) The ploidy level of the CD41⁺CD42c⁺ megakaryocytes was then evaluated with Hoechst by Flow cytometry. N = 3. (D) Cells produced at day 3 from CD9⁻CD150⁻ (DN), CD9⁺CD150⁻ (Prog), CD9⁺CD150^{dim} (MEP), and CD9⁺CD150^{bright} (MKp) cell populations were harvested and cultured in DMEM medium supplemented with 50 ng/mL TPO, 10 % Fetal Calf Serum, and 100 U/mL hirudin. (i) The proportion of proplatelet-forming megakaryocytes in the culture was determined by microscopic observation. Megakaryocytes were identified based on their size and/or the presence of proplatelets. N = 2. (ii) Representative photograph of a proplatelet bearing megakaryocyte by phase-contrast microscopy. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Discussion

The method described in this paper allows for the extraction and purification of mouse MEP and MKp. An important parameter in the optimization of the protocol was to obtain sufficient number of cells that would be compatible with most molecular- and cellular-based assays. The general practice of mouse bone collection for hematopoietic cell extraction usually consists in harvesting both the femurs and tibias of each mouse. The pelvic bone, another source of hematopoietic material, is thus often overlooked. The reasons for not collecting the iliac crest is the poor knowledge of the internal anatomy of the mouse skeleton and the fact that users

are classically collecting hindlimbs by cutting across or just above the femur head. In addition, it is often assumed that the marrow cells would not be flushed out of the iliac crest bone efficiently due to the presence of trabeculae, which are absent in the central part of the tibia and femur. In this protocol, these two concerns are addressed and a standardized, reliable, and time-effective method is presented that allows for proper flushing of each hindlimb bones, including the pelvic bone. In particular, the use of the iliac bone yields $105 \pm 7 \times 10^6$ cells per mouse while the classical method usually yields $42 \pm 5 \times 10^6$ cells. A major benefit of this method is the reduction in the number of animals required to obtain a given

number of target cells, thus providing more ethical and cost-effective experimental conditions. This procedure is therefore also applicable for any study requiring bone marrow cell suspension such as isolation of hematopoietic stem cells¹⁰ or the analysis of hematopoietic progenitor behavior in semi solid conditions¹¹.

Cell sorting using flow cytometry is a powerful technique with a major advantage in term of purity when compared to magnetic enrichment techniques, but the yield of cell sorting for rare populations can be lower than for more abundant populations. Magnetic depletion of unwanted cells beforehand is therefore a useful method to increase the frequency of the cells of interest. Here, the magnetic depletion procedure differs from the manufacturer's recommendation and takes into consideration the heterogeneity in the expression of the surface markers used to remove the unwanted lineage positive cells. With the typical, one-step protocols, lineage positive cells with the highest expression of surface markers will quickly saturate the magnetic beads. They will prevent the subsequent capture of the remaining labeled cells by competition and steric hindrance, thus significantly reducing the depletion efficacy. To address this problem, a two-step magnetic depletion was designed that allows for the sequential removal of all lineage-positive cells, therefore allowing for stringent depletions suitable for cell sorting.

Another critical parameter to achieve an efficient depletion is the appropriate labeling conditions of the unwanted lineage-positive cells. The antibody titration has therefore been specifically optimized. Using higher concentrations of antibodies will result in excessive rosetting of the magnetic beads and the non-specific depletion of lineage-negative cells of interest. The use of highly purified MEP and

MKp cell populations is an important tool in the study of megakaryopoiesis. In order to elucidate the mechanisms controlling this process, the study investigated the role of the cellular microenvironment and have shown that a fetal liver cell stromal cell population would support the differentiation of MKp¹⁰. The sorted population could also be used for molecular- or single cell-based analyses. This will be particularly relevant considering the emerging notion of megakaryocyte-biased HSC^{12,13,14}. The production of megakaryocyte directly from the HSC population without the generation of a bipotent progenitor would be an emergency pathway in response to stress¹³.

Disclosures

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgments

The authors wish to thank Monique Freund, Catherine Ziessel and Ketty for technical assistance. This work was supported by ARMESA (Association de Recherche et Développement en Médecine et Santé Publique), and by Grant ANR-17-CE14-0001-01 to Henri.de la.Salle.

References

1. Kaushansky, K. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood*. **111** (3), 981-986 (2008).
2. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I. L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. **404** (6774), 193-197 (2000).
3. Debili, N. et al. Characterization of a bipotent erythromegakaryocytic progenitor in human bone marrow. *Blood*. **88** (4), 1284-1296 (1996).

4. Forsberg, E. C., Serwold, T., Kogan, S., Weissman, I. L., Passegué, E. New evidence supporting megakaryocyte-erythrocyte potential of flk2/flt3+ multipotent hematopoietic progenitors. *Cell*. **126** (2), 415-426 (2006).
5. Vannucchi, A. M. et al. Identification and characterization of a bipotent (erythroid and megakaryocytic) cell precursor from the spleen of phenylhydrazine-treated mice. *Blood*. **95** (8), 2559-2568 (2000).
6. Pronk, C. J. et al. Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy. *Cell Stem Cell*. **1** (4), 428-442 (2007).
7. Nakorn, T. N., Miyamoto, T., Weissman, I. L. Characterization of mouse clonogenic megakaryocyte progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100** (1), 205-210 (2003).
8. Ng, A. P. et al. Characterization of thrombopoietin (TPO)-responsive progenitor cells in adult mouse bone marrow with in vivo megakaryocyte and erythroid potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **109** (7), 2364-2369 (2012).
9. Strassel, C. et al. Hirudin and heparin enable efficient megakaryocyte differentiation of mouse bone marrow progenitors. *Experimental Cell Research*. **318** (1), 25-32 (2012).
10. Brouard, N. et al. A unique microenvironment in the developing liver supports the expansion of megakaryocyte progenitors. *Blood Advances*. **1** (21), 1854-1866 (2017).
11. Boscher, J., Gachet, C., Lanza, F., Léon, C. Megakaryocyte culture in 3D methylcellulose-based hydrogel to improve cell maturation and study the impact of stiffness and confinement. *Journal of Visualized Experiments:JOVE*. In Preparation (2021).
12. Sanjuan-Pla, A. et al. Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature*. **502** (7470), 232-236 (2013).
13. Haas, S. et al. Inflammation-driven fast-track differentiation of HSCs into the megakaryocytic lineage. *Experimental Hematology*. **42** (8S), S14 (2014).
14. Shin, J. Y., Hu, W., Naramura, M., Park, C. Y. High c-Kit expression identifies hematopoietic stem cells with impaired self-renewal and megakaryocytic bias. *The Journal of Experimental Medicine*. **211** (2), 217-231 (2014).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abkowitz, J.L., Catlin, S.N., McCallie, M.T., and Gutter, P. (2002). Evidence that the number of hematopoietic stem cells per animal is conserved in mammals. *Blood* 100, 2665–2667 . DOI :10.1182/blood-2002-03-0822
- Adam, F., Kauskot, A., Kurowska, M., Goudin, N., Munoz, I., Bordet, J.-C., Huang, J.-D., Bryckaert, M., Fischer, A., Borgel, D., et al. (2018). Kinesin-1 Is a New Actor Involved in Platelet Secretion and Thrombus Stability. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38, 1037–1051 . DOI :10.1161/ATVBAHA.117.310373
- Aguilar, A., Weber, J., Boscher, J., Freund, M., Ziessel, C., Eckly, A., Magnenat, S., Bourdon, C., Hechler, B., Mangin, P.H., et al. (2019). Combined deficiency of RAB32 and RAB38 in the mouse mimics Hermansky-Pudlak syndrome and critically impairs thrombosis. *Blood Adv.* 3, 2368–2380 . DOI :10.1182/bloodadvances.2019031286
- Aillaud, C., Bosc, C., Saoudi, Y., Denarier, E., Peris, L., Sago, L., Taulet, N., Cieren, A., Tort, O., Magiera, M.M., et al. (2016). Evidence for new C-terminally truncated variants of α - and β -tubulins. *Mol. Biol. Cell* 27, 640–653 . DOI :10.1091/mbc.E15-03-0137
- Aillaud, C., Bosc, C., Peris, L., Bosson, A., Heemeryck, P., Van Dijk, J., Le Fric, J., Boulan, B., Vossier, F., Sanman, L.E., et al. (2017). Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCPs) that regulate neuron differentiation. *Science* 358, 1448–1453 . DOI :10.1126/science.aao4165
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193–197 . DOI :10.1038/35004599
- Akhmanova, A., and Steinmetz, M.O. (2015). Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 711–726 . DOI :10.1038/nrm4084
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2017). *Molecular Biology of the Cell* (W.W. Norton & Company) . DOI :10.1201/9781315735368
- Aliotta, A., Bertaggia Calderara, D., and Alberio, L. (2020). Flow Cytometric Monitoring of Dynamic Cytosolic Calcium, Sodium, and Potassium Fluxes Following Platelet Activation. *Cytometry. A* 97, 933–944 . DOI :10.1002/cyto.a.24017
- Alushin, G.M., Lander, G.C., Kellogg, E.H., Zhang, R., Baker, D., and Nogales, E. (2014). High-resolution microtubule structures reveal the structural transitions in $\alpha\beta$ -tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell* 157, 1117–1129 . DOI :10.1016/j.cell.2014.03.053
- Amos, L.A. (2004). Microtubule structure and its stabilisation. *Org. Biomol. Chem.* 2, 2153–2160 . DOI :10.1039/b403634d
- Amos, L.A., and Schlieper, D. (2005). Microtubules and maps. *Adv. Protein Chem.* 71, 257–298 . DOI :10.1016/S0065-3233(04)71007-4
- Arce, C.A., Hallak, M.E., Rodriguez, J.A., Barra, H.S., and Caputto, R. (1978). Capability of tubulin

and microtubules to incorporate and to release tyrosine and phenylalanine and the effect of the incorporation of these amino acids on tubulin assembly. *J. Neurochem.* 31, 205–210 . DOI :10.1111/j.1471-4159.1978.tb12449.x

- Arce, N.A., Cao, W., Brown, A.K., Legan, E.R., Wilson, M.S., Xu, E.-R., Berndt, M.C., Emsley, J., Zhang, X.F., and Li, R. (2021). Activation of von Willebrand factor via mechanical unfolding of its discontinuous autoinhibitory module. *Nat. Commun.* 12, 2360 . DOI :10.1038/s41467-021-22634-x
- Audebert, S., Desbruyères, E., Gruszczynski, C., Koulakoff, A., Gros, F., Denoulet, P., and Eddé, B. (1993). Reversible polyglutamylation of alpha- and beta-tubulin and microtubule dynamics in mouse brain neurons. *Mol. Biol. Cell* 4, 615–626 . DOI :10.1091/mbc.4.6.615
- Baatout, S., Chatelain, B., Staquet, P., Symann, M., and Chatelain, C. (1998). Augmentation of the number of nucleolar organizer regions in human megakaryocyte cell lines after induction of polyploidization by a microtubule inhibitor. *Eur. J. Clin. Invest.* 28, 138–144 . DOI :10.1046/j.1365-2362.1998.00250.x
- Baig, A.A., Haining, E.J., Geuss, E., Beck, S., Swieringa, F., Wanitchakool, P., Schuhmann, M.K., Stegner, D., Kunzelmann, K., Kleinschnitz, C., et al. (2016). TMEM16F-Mediated Platelet Membrane Phospholipid Scrambling Is Critical for Hemostasis and Thrombosis but not Thromboinflammation in Mice–Brief Report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 2152–2157 . DOI :10.1161/ATVBAHA.116.307727
- Balduini, A., Pallotta, I., Malara, A., Lova, P., Pecci, A., Viarengo, G., Balduini, C.L., and Torti, M. (2008). Adhesive receptors, extracellular proteins and myosin IIA orchestrate proplatelet formation by human megakaryocytes. *J. Thromb. Haemost.* 6, 1900–1907 . DOI :10.1111/j.1538-7836.2008.03132.x
- Barra, H.S., Arce, C.A., Rodríguez, J.A., and Caputto, R. (1974). Some common properties of the protein that incorporates tyrosine as a single unit and the microtubule proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 1384–1390 . DOI :10.1016/0006-291x(74)90351-9
- Barra, H.S., Arce, C.A., and Caputto, R. (1980). Total tubulin and its aminoacylated and non-aminoacylated forms during the development of rat brain. *Eur. J. Biochem.* 109, 439–446 . DOI :10.1111/j.1432-1033.1980.tb04813.x
- Barrachina, M.N., Pernes, G., Becker, I.C., Groeneveld, D., Luyendyk, J.P., Meikle, P.J., Lancaster, G.I., Murphy, A.J., and Machlus, K. (2021). Manipulation of Fatty Acid Metabolism Impairs Megakaryocyte Differentiation and Platelet Production. *Blood* 138, 577–577 . DOI :10.1182/blood-2021-151316
- Bartolini, F., and Gundersen, G.G. (2010). Formins and microtubules. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 164–173 . DOI :10.1016/j.bbamcr.2009.07.006
- Becker, R.P., and De Bruyn, P.P.H. (1976). The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *Am. J. Anat.* 145, 183–205 . DOI :10.1002/aja.1001450204

- Begonja, A.J., Pluthero, F.G., Suphamungmee, W., Giannini, S., Christensen, H., Leung, R., Lo, R.W., Nakamura, F., Lehman, W., Plomann, M., et al. (2015). FlnA binding to PACSIN2 F-BAR domain regulates membrane tubulation in megakaryocytes and platelets. *Blood* 126, 80–88 . DOI :10.1182/blood-2014-07-587600
- Behnke, O. (1965). Further studies on microtubules. A marginal bundle in human and rat thrombocytes. *J. Ultrastruct. Res.* 13, 469–477 . DOI :10.1016/s0022-5320(65)90009-2
- 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, 412–433 . DOI :10.1016/s0022-5320(68)80046-2
- Behnke, O. (1969). An electron microscope study of the rat megacaryocyte. II. Some aspects of platelet release and microtubules. *J. Ultrastruct. Res.* 26, 111–129 . DOI :10.1016/s0022-5320(69)90039-2
- Behnke, O., and Zelander, T. (1967). Filamentous substructure of microtubules of the marginal bundle of mammalian blood platelets. *J. Ultrastruct. Res.* 19, 147–165 . DOI :10.1016/s0022-5320(67)80065-0
- Belvindrah, R., Natarajan, K., Shabajee, P., Bruel-Jungerman, E., Bernard, J., Goutierre, M., Moutkine, I., Jaglin, X.H., Savariradjane, M., Irinopoulou, T., et al. (2017). Mutation of the α -tubulin Tuba1a leads to straighter microtubules and perturbs neuronal migration. *J. Cell Biol.* 216, 2443–2461 . DOI :10.1083/jcb.201607074
- Ben-Ze'ev, A., Farmer, S.R., and Penman, S. (1979). Mechanisms of regulating tubulin synthesis in cultured mammalian cells. *Cell* 17, 319–325 . DOI :10.1016/0092-8674(79)90157-0
- Bender, M., Thon, J.N., Ehrlicher, A.J., Wu, S., Mazutis, L., Deschmann, E., Sola-Visner, M., Italiano, J.E., and Hartwig, J.H. (2015). Microtubule sliding drives proplatelet elongation and is dependent on cytoplasmic dynein. *Blood* 125, 860–868 . DOI :10.1182/blood-2014-09-600858
- Berntorp, E., Fischer, K., Hart, D.P., Mancuso, M.E., Stephensen, D., Shapiro, A.D., and Blanchette, V. (2021). Haemophilia. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 7, 45 . DOI :10.1038/s41572-021-00278-x
- Berthet, J., Damien, P., Hamzeh-Cognasse, H., Arthaud, C.-A., Eyraud, M.-A., Zéni, F., Pozzetto, B., McNicol, A., Garraud, O., and Cognasse, F. (2012). Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion. *Clin. Immunol.* 145, 189–200 . DOI :10.1016/j.clim.2012.09.004
- Bettencourt-Dias, M., and Glover, D.M. (2007). Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 451–463 . DOI :10.1038/nrm2180
- Bhamidipati, A., Lewis, S.A., and Cowan, N.J. (2000). ADP ribosylation factor-like protein 2 (Arl2) regulates the interaction of tubulin-folding cofactor D with native tubulin. *J. Cell Biol.* 149, 1087–1096 . DOI :10.1083/jcb.149.5.1087

- Biedzinski, S., Agsu, G., Vianay, B., Delord, M., Blanchoin, L., Larghero, J., Faivre, L., Théry, M., and Brunet, S. (2020). Microtubules control nuclear shape and gene expression during early stages of hematopoietic differentiation. *EMBO J.* 39, 1–15 . DOI :10.15252/embj.2019103957
- Bizzozzero, J. (1882). Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. *Arch. Für Pathol. Anat. Und Physiol. Und Für Klin. Med.* 90, 261–332 . DOI :10.1007/BF01931360
- Blin, A., Le Goff, A., Magniez, A., Poirault-Chassac, S., Teste, B., Sicot, G., Nguyen, K.A., Hamdi, F.S., Reyssat, M., and Baruch, D. (2016). Microfluidic model of the platelet-generating organ: beyond bone marrow biomimetics. *Sci. Rep.* 6, 21700 . DOI :10.1038/srep21700
- Bodakuntla, S., Jijumon, A.S., Villablanca, C., Gonzalez-Billault, C., and Janke, C. (2019). Microtubule-Associated Proteins: Structuring the Cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 29, 804–819 . DOI :10.1016/j.tcb.2019.07.004
- Bodakuntla, S., Yuan, X., Genova, M., Gadadhar, S., Leboucher, S., Birling, M., Klein, D., Martini, R., Janke, C., and Magiera, M.M. (2021). Distinct roles of α - and β -tubulin polyglutamylation in controlling axonal transport and in neurodegeneration. *EMBO J.* 40, e108498 . DOI :10.15252/embj.2021108498
- Bodaleo, F.J., and Gonzalez-Billault, C. (2016). The Presynaptic Microtubule Cytoskeleton in Physiological and Pathological Conditions: Lessons from *Drosophila* Fragile X Syndrome and Hereditary Spastic Paraplegias. *Front. Mol. Neurosci.* 9, 60 . DOI :10.3389/fnmol.2016.00060
- Bogusławska, D.M., Machnicka, B., Hryniewicz-Jankowska, A., and Czogalla, A. (2014). Spectrin and phospholipids - the current picture of their fascinating interplay. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 19, 158–179 . DOI :10.2478/s11658-014-0185-5
- Bonnefoy, A., Romijn, R.A., Vandervoort, P.A.H., VAN Rompaey, I., Vermylen, J., and Hoylaerts, M.F. (2006). von Willebrand factor A1 domain can adequately substitute for A3 domain in recruitment of flowing platelets to collagen. *J. Thromb. Haemost.* 4, 2151–2161 . DOI :10.1111/j.1538-7836.2006.02111.x
- Borisy, G.G., and Taylor, E.W. (1967). The mechanism of action of colchicine. Colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus. *J. Cell Biol.* 34, 535–548 . DOI :10.1083/jcb.34.2.535
- Born, G. V (1962). Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 194, 927–929 . DOI :10.1038/194927b0
- Bornert, A., Boscher, J., Pertuy, F., Eckly, A., Stegner, D., Strassel, C., Gachet, C., Lanza, F., and Léon, C. (2021). Cytoskeletal-based mechanisms differently regulate in vivo and in vitro proplatelet formation. *Haematologica* 106, 1368–1380 . DOI :10.3324/haematol.2019.239111
- Bosch Grau, M., Masson, C., Gadadhar, S., Rocha, C., Tort, O., Marques Sousa, P., Vacher, S., Bieche, I., and Janke, C. (2017). Alterations in the balance of tubulin glycylation and

- glutamylolation in photoreceptors leads to retinal degeneration. *J. Cell Sci.* 130, 938–949 . DOI :10.1242/jcs.199091
- Boscher, J., Guinard, I., Eckly, A., Lanza, F., and Léon, C. (2020). Blood platelet formation at a glance. *J. Cell Sci.* 133, 1–8 . DOI :10.1242/jcs.244731
- Bowler, M., Kong, D., Sun, S., Nanjundappa, R., Evans, L., Farmer, V., Holland, A., Mahjoub, M.R., Sui, H., and Loncarek, J. (2019). High-resolution characterization of centriole distal appendage morphology and dynamics by correlative STORM and electron microscopy. *Nat. Commun.* 10, 993 . DOI :10.1038/s41467-018-08216-4
- Boyles, J., Fox, J.E.B., Phillips, D.R., and Stenberg, P.E. (1985). Organization of the cytoskeleton in resting, discoid platelets: preservation of actin filaments by a modified fixation that prevents osmium damage. *J. Cell Biol.* 101, 1463–1472 . DOI :10.1083/jcb.101.4.1463
- Bré, M.H., Redeker, V., Quibell, M., Darmanaden-Delorme, J., Bressac, C., Cosson, J., Huitorel, P., Schmitter, J.M., Rossler, J., Johnson, T., et al. (1996). Axonemal tubulin polyglycylation probed with two monoclonal antibodies: widespread evolutionary distribution, appearance during spermatozoan maturation and possible function in motility. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 4, 727–738 . DOI :10.1242/jcs.109.4.727
- Brewer, D.B. (2006). Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. *Br. J. Haematol.* 133, 251–258 . DOI :10.1111/j.1365-2141.2006.06036.x
- Broudy, V.C., Lin, N.L., and Kaushansky, K. (1995). Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro. *Blood* 85, 1719–1726 . DOI :10.1182/blood.v85.7.1719.bloodjournal8571719
- Brown, E., Carlin, L.M., Nerlov, C., Lo Celso, C., and Poole, A.W. (2018). Multiple membrane extrusion sites drive megakaryocyte migration into bone marrow blood vessels. *Life Sci. Alliance* 1, 1–12 . DOI :10.26508/lisa.201800061
- Broze, G.J., Yin, Z.F., and Lasky, N. (2001). A tail vein bleeding time model and delayed bleeding in hemophilic mice. *Thromb. Haemost.* 85, 747–748 . DOI :10.1055/s-0037-1615666
- Bryan, J., and Wilson, L. (1971). Are cytoplasmic microtubules heteropolymers? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68, 1762–1766 . DOI :10.1073/pnas.68.8.1762
- Bugnard, E., Zaal, K.J.M., and Ralston, E. (2005). Reorganization of microtubule nucleation during muscle differentiation. *Cell Motil. Cytoskeleton* 60, 1–13 . DOI :10.1002/cm.20042
- Burkhart, J.M., Vaudel, M., Gambaryan, S., Radau, S., Walter, U., Martens, L., Geiger, J., Sickmann, A., and Zahedi, R.P. (2012). The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood* 120, e73-82 . DOI :10.1182/blood-2012-04-416594
- Burley, K., Westbury, S.K., and Mumford, A.D. (2018). TUBB1 variants and human platelet traits.

Platelets 29, 209–211 . DOI :10.1080/09537104.2017.1411587

- Cabeen, M.T., and Jacobs-Wagner, C. (2010). The bacterial cytoskeleton. *Annu. Rev. Genet.* 44, 365–392 . DOI :10.1146/annurev-genet-102108-134845
- Caccese, D., Praticò, D., Ghiselli, A., Natoli, S., Pignatelli, P., Sanguigni, V., Iuliano, L., and Violi, F. (2000). Superoxide anion and hydroxyl radical release by collagen-induced platelet aggregation--role of arachidonic acid metabolism. *Thromb. Haemost.* 83, 485–490 . DOI :10.1055/s-0037-1613841
- Canault, M., Ghalloussi, D., Grosdidier, C., Guinier, M., Perret, C., Chelghoum, N., Germain, M., Raslova, H., Peiretti, F., Morange, P.E., et al. (2014). Human CalDAG-GEFI gene (RASGRP2) mutation affects platelet function and causes severe bleeding. *J. Exp. Med.* 211, 1349–1362 . DOI :10.1084/jem.20130477
- Caplow, M., and Shanks, J. (1996). Evidence that a single monolayer tubulin-GTP cap is both necessary and sufficient to stabilize microtubules. *Mol. Biol. Cell* 7, 663–675 . DOI :10.1091/mbc.7.4.663
- Carrier, M.F., and Pantaloni, D. (1981). Kinetic analysis of guanosine 5'-triphosphate hydrolysis associated with tubulin polymerization. *Biochemistry* 20, 1918–1924 . DOI :10.1021/bi00510a030
- Caron, J.M. (1997). Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: I. In vivo and cell-free studies. *Mol. Biol. Cell* 8, 621–636 . DOI :10.1091/mbc.8.4.621
- Carrington, P.A., Hill, R.J., Stenberg, P.E., Levin, J., Corash, L., Schreurs, J., Baker, G., and Levin, F.C. (1991). Multiple in vivo effects of interleukin-3 and interleukin-6 on murine megakaryocytopoiesis. *Blood* 77, 34–41 . DOI :10.1182/blood.v77.1.34.34
- Chaaban, S., Jariwala, S., Hsu, C.-T., Redemann, S., Kollman, J.M., Müller-Reichert, T., Sept, D., Bui, K.H., and Brouhard, G.J. (2018). The Structure and Dynamics of *C. elegans* Tubulin Reveals the Mechanistic Basis of Microtubule Growth. *Dev. Cell* 47, 191–204.e8 . DOI :10.1016/j.devcel.2018.08.023
- Chakraborti, S., Natarajan, K., Curiel, J., Janke, C., and Liu, J. (2016). The emerging role of the tubulin code: From the tubulin molecule to neuronal function and disease. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 73, 521–550 . DOI :10.1002/cm.21290
- Chang, H.-Y., Yazdani, A., Li, X., Douglas, K.A.A., Mantzoros, C.S., and Karniadakis, G.E. (2018). Quantifying Platelet Margination in Diabetic Blood Flow. *Biophys. J.* 115, 1371–1382 . DOI :10.1016/j.bpj.2018.08.031
- Chen, Y., Aardema, J., Kale, S., Whichard, Z.L., Awomolo, A., Blanchard, E., Chang, B., Myers, D.R., Ju, L., Tran, R., et al. (2013). Loss of the F-BAR protein CIP4 reduces platelet production by impairing membrane-cytoskeleton remodeling. *Blood* 122, 1695–1706 . DOI :10.1182/blood-2013-03-484550

- Choi, E.S., Nichol, J.L., Hokom, M.M., Hornkohl, A.C., and Hunt, P. (1995). Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood* 85, 402–413 . DOI :10.1182/blood.v85.2.402.402
- Chu, C., Geng, Y., Zhou, Y., and Sicinski, P. (2021). Cyclin E in normal physiology and disease states. *Trends Cell Biol.* 31, 732–746 . DOI :10.1016/j.tcb.2021.05.001
- Clark, S.R., Ma, A.C., Tavener, S.A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M.M., Patel, K.D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G.D., et al. (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* 13, 463–469 . DOI :10.1038/nm1565
- Cleveland, D.W., Lopata, M.A., Sherline, P., and Kirschner, M.W. (1981). Unpolymerized tubulin modulates the level of tubulin mRNAs. *Cell* 25, 537–546 . DOI :10.1016/0092-8674(81)90072-6
- Cognasse, F., Hamzeh-Cognasse, H., Lafarge, S., Delezay, O., Pozzetto, B., McNicol, A., and Garraud, O. (2008). Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets. *Br. J. Haematol.* 141, 84–91 . DOI :10.1111/j.1365-2141.2008.06999.x
- Cowan, N.J. (1998). Mammalian cytosolic chaperonin. *Methods Enzymol.* 290, 230–241 . DOI :10.1016/s0076-6879(98)90022-2
- Cowan, N.J., and Lewis, S.A. (2001). Type II chaperonins, prefoldin, and the tubulin-specific chaperones. *Adv. Protein Chem.* 59, 73–104 . DOI :10.1016/s0065-3233(01)59003-8
- Crane, G.M., Jeffery, E., and Morrison, S.J. (2017). Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 573–590 . DOI :10.1038/nri.2017.53
- Cranmer, S.L., Ashworth, K.J., Yao, Y., Berndt, M.C., Ruggeri, Z.M., Andrews, R.K., and Jackson, S.P. (2011). High shear-dependent loss of membrane integrity and defective platelet adhesion following disruption of the GPIIb α -filamin interaction. *Blood* 117, 2718–2727 . DOI :10.1182/blood-2010-07-296194
- Crawley, J.T.B., Zanardelli, S., Chion, C.K.N.K., and Lane, D.A. (2007). The central role of thrombin in hemostasis. *J. Thromb. Haemost.* 5 *Suppl 1*, 95–101 . DOI :10.1111/j.1538-7836.2007.02500.x
- Cruz, M.A., Yuan, H., Lee, J.R., Wise, R.J., and Handin, R.I. (1995). Interaction of the von Willebrand factor (vWF) with collagen. Localization of the primary collagen-binding site by analysis of recombinant vWF a domain polypeptides. *J. Biol. Chem.* 270, 10822–10827 . DOI :10.1074/jbc.270.18.10822
- Cuveillier, C., Boulan, B., Ravanello, C., Denarier, E., Deloulme, J.-C., Gory-Fauré, S., Delphin, C., Bosc, C., Arnal, I., and Andrieux, A. (2021). Beyond Neuronal Microtubule Stabilization: MAP6 and CRMPS, Two Converging Stories. *Front. Mol. Neurosci.* 14, 665693 . DOI :10.3389/fnmol.2021.665693

- Debili, N., Wendling, F., Katz, A., Guichard, J., Breton-Gorius, J., Hunt, P., and Vainchenker, W. (1995). The Mpl-ligand or thrombopoietin or megakaryocyte growth and differentiative factor has both direct proliferative and differentiative activities on human megakaryocyte progenitors. *Blood* 86, 2516–2525 . DOI :10.1182/blood.v86.7.2516.2516
- Deppermann, C., Kratofil, R.M., Peiseler, M., David, B.A., Zindel, J., Castanheira, F.V.E.S., van der Wal, F., Carestia, A., Jenne, C.N., Marth, J.D., et al. (2020). Macrophage galactose lectin is critical for Kupffer cells to clear aged platelets. *J. Exp. Med.* 217 . DOI :10.1084/jem.20190723
- Diagouraga, B., Grichine, A., Fertin, A., Wang, J., Khochbin, S., and Sadoul, K. (2014). Motor-driven marginal band coiling promotes cell shape change during platelet activation. *J. Cell Biol.* 204, 177–185 . DOI :10.1083/jcb.201306085
- Diggle, C.P., Martinez-Garay, I., Molnar, Z., Brinkworth, M.H., White, E., Fowler, E., Hughes, R., Hayward, B.E., Carr, I.M., Watson, C.M., et al. (2017). A tubulin alpha 8 mouse knockout model indicates a likely role in spermatogenesis but not in brain development. *PLoS One* 12, e0174264 . DOI :10.1371/journal.pone.0174264
- van Dijk, J., Bompard, G., Cau, J., Kunishima, S., Rabeharivelo, G., Mateos-Langerak, J., Cazevieuille, C., Cavelier, P., Boizet-Bonhoure, B., Delsert, C., et al. (2018). Microtubule polyglutamylation and acetylation drive microtubule dynamics critical for platelet formation. *BMC Biol.* 16, 116 . DOI :10.1186/s12915-018-0584-6
- DiMinno, G., and Silver, M.J. (1983). Mouse antithrombotic assay: a simple method for the evaluation of antithrombotic agents in vivo. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 225, 57–60
- Dimitrov, A., Quesnoit, M., Moutel, S., Cantaloube, I., Poüs, C., and Perez, F. (2008). Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. *Science* 322, 1353–1356 . DOI :10.1126/science.1165401
- Dinarvand, P., and Moser, K.A. (2019). Protein C Deficiency. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 143, 1281–1285 . DOI :10.5858/arpa.2017-0403-RS
- Dogterom, M., and Koenderink, G.H. (2019). Actin-microtubule crosstalk in cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 38–54 . DOI :10.1038/s41580-018-0067-1
- Drabek, K., Gutiérrez, L., Vermeij, M., Clapes, T., Patel, S.R., Boisset, J.-C., van Haren, J., Pereira, A.L., Liu, Z., Akinci, U., et al. (2012). The microtubule plus-end tracking protein CLASP2 is required for hematopoiesis and hematopoietic stem cell maintenance. *Cell Rep.* 2, 781–788 . DOI :10.1016/j.celrep.2012.08.040
- Drechsel, D.N., Hyman, A.A., Cobb, M.H., and Kirschner, M.W. (1992). Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol. Biol. Cell* 3, 1141–1154 . DOI :10.1091/mbc.3.10.1141
- Dunn, S., Morrison, E.E., Liverpool, T.B., Molina-París, C., Cross, R.A., Alonso, M.C., and Peckham,

- M. (2008). Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *J. Cell Sci.* *121*, 1085–1095 . DOI :10.1242/jcs.026492
- Dunois-Lardé, C., Capron, C., Fichelson, S., Bauer, T., Cramer-Bordé, E., and Baruch, D. (2009). Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet production. *Blood* *114*, 1875–1883 . DOI :10.1182/blood-2009-03-209205
- Dupuis, A., Bordet, J.-C., Eckly, A., and Gachet, C. (2020). Platelet δ -Storage Pool Disease: An Update. *J. Clin. Med.* *9*, 2508 . DOI :10.3390/jcm9082508
- Eckly, A., Hechler, B., Freund, M., Zerr, M., Cazenave, J.-P., Lanza, F., Mangin, P.H., and Gachet, C. (2011). Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* *9*, 779–789 . DOI :10.1111/j.1538-7836.2011.04218.x
- Eckly, A., Strassel, C., Cazenave, J.-P., Lanza, F., Léon, C., and Gachet, C. (2012). Characterization of megakaryocyte development in the native bone marrow environment. *Methods Mol. Biol.* *788*, 175–192 . DOI :10.1007/978-1-61779-307-3_13
- Eckly, A., Heijnen, H., Pertuy, F., Geerts, W., Proamer, F., Rinckel, J.-Y., Léon, C., Lanza, F., and Gachet, C. (2014). Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood* *123*, 921–930 . DOI :10.1182/blood-2013-03-492330
- Eckly, A., Scandola, C., Oprescu, A., Michel, D., Rinckel, J., Proamer, F., Hoffmann, D., Receveur, N., Léon, C., Bear, J.E., et al. (2020). Megakaryocytes use in vivo podosome-like structures working collectively to penetrate the endothelial barrier of bone marrow sinusoids. *J. Thromb. Haemost.* *18*, 2987–3001 . DOI :10.1111/jth.15024
- Eddé, B., Rossier, J., Le Caer, J.P., Desbruyères, E., Gros, F., and Denoulet, P. (1990). Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. *Science* *247*, 83–85 . DOI :10.1126/science.1967194
- Eipper, B.A. (1972). Rat brain microtubule protein: purification and determination of covalently bound phosphate and carbohydrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *69*, 2283–2287 . DOI :10.1073/pnas.69.8.2283
- Elagib, K.E., Racke, F.K., Mogass, M., Khetawat, R., Delehanty, L.L., and Goldfarb, A.N. (2003). RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood* *101*, 4333–4341 . DOI :10.1182/blood-2002-09-2708
- Eliades, A., Papadantonakis, N., and Ravid, K. (2010). New roles for cyclin E in megakaryocytic polyploidization. *J. Biol. Chem.* *285*, 18909–18917 . DOI :10.1074/jbc.M110.102145
- Ellis, L., Pan, Y., Smyth, G.K., George, D.J., McCormack, C., Williams-Truax, R., Mita, M., Beck, J., Burris, H., Ryan, G., et al. (2008). Histone deacetylase inhibitor panobinostat induces clinical responses with associated alterations in gene expression profiles in cutaneous T-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* *14*, 4500–4510 . DOI :10.1158/1078-0432.CCR-07-4262
- Emeis, J.J., Jirouskova, M., Muchitsch, E.-M., Shet, A.S., Smyth, S.S., and Johnson, G.J. (2007). A

- guide to murine coagulation factor structure, function, assays, and genetic alterations. *J. Thromb. Haemost.* 5, 670–679 . DOI :10.1111/j.1538-7836.2007.02408.x
- Erck, C., Peris, L., Andrieux, A., Meissirel, C., Gruber, A.D., Vernet, M., Schweitzer, A., Saoudi, Y., Pointu, H., Bosc, C., et al. (2005). A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7853–7858 . DOI :10.1073/pnas.0409626102
- Ersfeld, K., Wehland, J., Plessmann, U., Dodemont, H., Gerke, V., and Weber, K. (1993). Characterization of the tubulin-tyrosine ligase. *J. Cell Biol.* 120, 725–732 . DOI :10.1083/jcb.120.3.725
- Eshun-Wilson, L., Zhang, R., Portran, D., Nachury, M. V., Toso, D.B., Löhr, T., Vendruscolo, M., Bonomi, M., Fraser, J.S., and Nogales, E. (2019). Effects of α -tubulin acetylation on microtubule structure and stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 10366–10371 . DOI :10.1073/pnas.1900441116
- Falet, H. (2017). Anatomy of the Platelet Cytoskeleton. In *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders*, (Cham: Springer International Publishing), pp. 139–156 . DOI :10.1007/978-3-319-47462-5_11
- Fidler, T.P., Campbell, R.A., Funari, T., Dunne, N., Balderas Angeles, E., Middleton, E.A., Chaudhuri, D., Weyrich, A.S., and Abel, E.D. (2017). Deletion of GLUT1 and GLUT3 Reveals Multiple Roles for Glucose Metabolism in Platelet and Megakaryocyte Function. *Cell Rep.* 20, 881–894 . DOI :10.1016/j.celrep.2017.06.083
- Findeisen, P., Mühlhausen, S., Dempewolf, S., Hertzog, J., Zietlow, A., Carlomagno, T., and Kollmar, M. (2014). Six subgroups and extensive recent duplications characterize the evolution of the eukaryotic tubulin protein family. *Genome Biol. Evol.* 6, 2274–2288 . DOI :10.1093/gbe/evu187
- Fitch-Tewfik, J.L., and Flaumenhaft, R. (2013). Platelet granule exocytosis: a comparison with chromaffin cells. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 4, 77 . DOI :10.3389/fendo.2013.00077
- Flaumenhaft, R., Dilks, J.R., Rozenvayn, N., Monahan-Earley, R.A., Feng, D., and Dvorak, A.M. (2005). The actin cytoskeleton differentially regulates platelet alpha-granule and dense-granule secretion. *Blood* 105, 3879–3887 . DOI :10.1182/blood-2004-04-1392
- Flemming, W. (1880). *Contributions to the Knowledge of the Cell and Its Vital Processes* [Translated from German]. *J. Cell Biol.* 25, 3–69 . DOI :10.1083/jcb.25.1.3
- Foster, C.J., Prosser, D.M., Agans, J.M., Zhai, Y., Smith, M.D., Lachowicz, J.E., Zhang, F.L., Gustafson, E., Monsma, F.J., Wiekowski, M.T., et al. (2001). Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *J. Clin. Invest.* 107, 1591–1598 . DOI :10.1172/JCI12242
- Fourest-Lieuvin, A., Peris, L., Gache, V., Garcia-Saez, I., Juillan-Binard, C., Lantez, V., and Job, D. (2006). Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Mol. Biol. Cell* 17, 1041–1050 . DOI :10.1091/mbc.e05-07-0621

- Fourriere, L., Jimenez, A.J., Perez, F., and Boncompain, G. (2020). The role of microtubules in secretory protein transport. *J. Cell Sci.* *133*, jcs237016 . DOI :10.1242/jcs.237016
- Freson, K., De Vos, R., Wittevrongel, C., Thys, C., Defoor, J., Vanhees, L., Vermylen, J., Peerlinck, K., and Van Geet, C. (2005). The TUBB1 Q43P functional polymorphism reduces the risk of cardiovascular disease in men by modulating platelet function and structure. *Blood* *106*, 2356–2362 . DOI :10.1182/blood-2005-02-0723
- Frost, A., Unger, V.M., and De Camilli, P. (2009). The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules. *Cell* *137*, 191–196 . DOI :10.1016/j.cell.2009.04.010
- Fujiwara, Y., Browne, C.P., Cunniff, K., Goff, S.C., and Orkin, S.H. (1996). Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 12355–12358 . DOI :10.1073/pnas.93.22.12355
- Fukushige, T., Siddiqui, Z.K., Chou, M., Culotti, J.G., Gogonea, C.B., Siddiqui, S.S., and Hamelin, M. (1999). MEC-12, an alpha-tubulin required for touch sensitivity in *C. elegans*. *J. Cell Sci.* *112*, 395–403 . DOI :10.1242/jcs.112.3.395
- Gadadhar, S., Bodakuntla, S., Natarajan, K., and Janke, C. (2017). The tubulin code at a glance. *J. Cell Sci.* *130*, 1347–1353 . DOI :10.1242/jcs.199471
- Gadadhar, S., Dadi, H., Bodakuntla, S., Schnitzler, A., Bièche, I., Rusconi, F., and Janke, C. (2017). Tubulin glycylation controls primary cilia length. *J. Cell Biol.* *216*, 2701–2713 . DOI :10.1083/jcb.201612050
- Gadadhar, S., Alvarez Viar, G., Hansen, J.N., Gong, A., Kostarev, A., Ialy-Radio, C., Leboucher, S., Whitfield, M., Ziyat, A., Touré, A., et al. (2021). Tubulin glycylation controls axonemal dynein activity, flagellar beat, and male fertility. *Science* *371* . DOI :10.1126/science.abd4914
- Gaertner, F., Ahmad, Z., Rosenberger, G., Fan, S., Nicolai, L., Busch, B., Yavuz, G., Luckner, M., Ishikawa-Ankerhold, H., Hennel, R., et al. (2017). Migrating Platelets Are Mechano-scavengers that Collect and Bundle Bacteria. *Cell* *171*, 1368–1382.e23 . DOI :10.1016/j.cell.2017.11.001
- Gale, A.J. (2011). Continuing education course #2: current understanding of hemostasis. *Toxicol. Pathol.* *39*, 273–280 . DOI :10.1177/0192623310389474
- Gao, Y., Vainberg, I.E., Chow, R.L., and Cowan, N.J. (1993). Two cofactors and cytoplasmic chaperonin are required for the folding of alpha- and beta-tubulin. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 2478–2485 . DOI :10.1128/mcb.13.4.2478-2485.1993
- Gao, Y., Smith, E., Ker, E., Campbell, P., Cheng, E., Zou, S., Lin, S., Wang, L., Halene, S., and Krause, D.S. (2012). Role of RhoA-specific guanine exchange factors in regulation of endomitosis in megakaryocytes. *Dev. Cell* *22*, 573–584 . DOI :10.1016/j.devcel.2011.12.019
- Gasic, I., and Mitchison, T.J. (2019). Autoregulation and repair in microtubule homeostasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* *56*, 80–87 . DOI :10.1016/j.ceb.2018.10.003

- Gazzaniga, V., and Ottini, L. (2001). The discovery of platelets and their function. *Vesalius VII*, 22–26
- Ge, S., White, J.G., and Haynes, C.L. (2012). Cytoskeletal F-actin, not the circumferential coil of microtubules, regulates platelet dense-body granule secretion. *Platelets* 23, 259–263 . DOI :10.3109/09537104.2011.620657
- Geddis, A.E., Linden, H.M., and Kaushansky, K. (2002). Thrombopoietin: a pan-hematopoietic cytokine. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 61–73 . DOI :10.1016/s1359-6101(01)00030-2
- Van Geet, C., Izzi, B., Labarque, V., and Freson, K. (2009). Human platelet pathology related to defects in the G-protein signaling cascade. *J. Thromb. Haemost.* 7 *Suppl 1*, 282–286 . DOI :10.1111/j.1538-7836.2009.03399.x
- Geng, Y., Yu, Q., Sicinska, E., Das, M., Schneider, J.E., Bhattacharya, S., Rideout, W.M., Bronson, R.T., Gardner, H., and Sicinski, P. (2003). Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* 114, 431–443 . DOI :10.1016/s0092-8674(03)00645-7
- Gestaut, D., Roh, S.H., Ma, B., Pintilie, G., Joachimiak, L.A., Leitner, A., Walzthoeni, T., Aebersold, R., Chiu, W., and Frydman, J. (2019). The Chaperonin TRiC/CCT Associates with Prefoldin through a Conserved Electrostatic Interface Essential for Cellular Proteostasis. *Cell* 177, 751–765.e15 . DOI :10.1016/j.cell.2019.03.012
- Getz, T.M., Dangelmaier, C.A., Jin, J., Daniel, J.L., and Kunapuli, S.P. (2010). Differential phosphorylation of myosin light chain (Thr)18 and (Ser)19 and functional implications in platelets. *J. Thromb. Haemost.* 8, 2283–2293 . DOI :10.1111/j.1538-7836.2010.04000.x
- Gilmore-Hall, S., Kuo, J., Ward, J.M., Zahra, R., Morrison, R.S., Perkins, G., and La Spada, A.R. (2019). CCP1 promotes mitochondrial fusion and motility to prevent Purkinje cell neuron loss in pcd mice. *J. Cell Biol.* 218, 206–219 . DOI :10.1083/jcb.201709028
- Gittes, F., Mickey, B., Nettleton, J., and Howard, J. (1993). Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J. Cell Biol.* 120, 923–934 . DOI :10.1083/jcb.120.4.923
- Gittes, F., Meyhöfer, E., Baek, S., and Howard, J. (1996). Directional loading of the kinesin motor molecule as it buckles a microtubule. *Biophys. J.* 70, 418–429 . DOI :10.1016/S0006-3495(96)79585-1
- Gogia, S., and Neelamegham, S. (2015). Role of fluid shear stress in regulating VWF structure, function and related blood disorders. *Biorheology* 52, 319–335 . DOI :10.3233/BIR-15061
- Golebiewska, E.M., and Poole, A.W. (2015). Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.* 29, 153–162 . DOI :10.1016/j.blre.2014.10.003
- de Graaf, C.A., and Metcalf, D. (2011). Thrombopoietin and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* 10, 1582–1589 . DOI :10.4161/cc.10.10.15619
- Greene, T.K., Schiviz, A., Hoellriegel, W., Poncz, M., Muchitsch, E.-M., and Animal Models

- Subcommittee of the Scientific And Standardization Committee Of The Isth (2010). Towards a standardization of the murine tail bleeding model. *J. Thromb. Haemost.* 8, 2820–2822 . DOI :10.1111/j.1538-7836.2010.04084.x
- Greer, C.A., and Shepherd, G.M. (1982). Mitral cell degeneration and sensory function in the neurological mutant mouse Purkinje cell degeneration (PCD). *Brain Res.* 235, 156–161 . DOI :10.1016/0006-8993(82)90206-2
- Grover, S.P., and Mackman, N. (2018). Tissue Factor: An Essential Mediator of Hemostasis and Trigger of Thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38, 709–725 . DOI :10.1161/ATVBAHA.117.309846
- Grover, S.P., and Mackman, N. (2020). How useful are ferric chloride models of arterial thrombosis? *Platelets* 31, 432–438 . DOI :10.1080/09537104.2019.1678119
- Gudimchuk, N.B., and McIntosh, J.R. (2021). Regulation of microtubule dynamics, mechanics and function through the growing tip. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 22, 777–795 . DOI :10.1038/s41580-021-00399-x
- Guéguen, P., Dupuis, A., Py, J.-Y., Desprès, A., Masson, E., Le Marechal, C., Cooper, D.N., Gachet, C., Chen, J.-M., and Férec, C. (2020). Pathogenic and likely pathogenic variants in at least five genes account for approximately 3% of mild isolated nonsyndromic thrombocytopenia. *Transfusion* 60, 2419–2431 . DOI :10.1111/trf.15992
- Gundersen, G.G., and Bulinski, J.C. (1986). Microtubule arrays in differentiated cells contain elevated levels of a post-translationally modified form of tubulin. *Eur. J. Cell Biol.* 42, 288–294
- Gutmann, C., Siow, R., Gwozdz, A.M., Saha, P., and Smith, A. (2020). Reactive Oxygen Species in Venous Thrombosis. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–27 . DOI :10.3390/ijms21061918
- Haas, S., Hansson, J., Klimmeck, D., Loeffler, D., Velten, L., Uckelmann, H., Wurzer, S., Prendergast, Á.M., Schnell, A., Hexel, K., et al. (2015). Inflammation-Induced Emergency Megakaryopoiesis Driven by Hematopoietic Stem Cell-like Megakaryocyte Progenitors. *Cell Stem Cell* 17, 422–434 . DOI :10.1016/j.stem.2015.07.007
- Hallak, M.E., Rodriguez, J.A., Barra, H.S., and Caputto, R. (1977). Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin. *FEBS Lett.* 73, 147–150 . DOI :10.1016/0014-5793(77)80968-x
- Hamel, E., Batra, J.K., and Lin, C.M. (1986). Direct incorporation of guanosine 5'-diphosphate into microtubules without guanosine 5'-triphosphate hydrolysis. *Biochemistry* 25, 7054–7062 . DOI :10.1021/bio0370a045
- Handagama, P., Bainton, D.F., Jacques, Y., Conn, M.T., Lazarus, R.A., and Shuman, M.A. (1993). Kistrin, an integrin antagonist, blocks endocytosis of fibrinogen into guinea pig megakaryocyte and platelet alpha-granules. *J. Clin. Invest.* 91, 193–200 . DOI :10.1172/JCI116170

- Handagama, P.J., Feldman, B.F., Jain, N.C., Farver, T.B., and Kono, C.S. (1987). In vitro platelet release by rat megakaryocytes: effect of metabolic inhibitors and cytoskeletal disrupting agents. *Am. J. Vet. Res.* *48*, 1142–1146
- Hansen, W.J., Cowan, N.J., and Welch, W.J. (1999). Prefoldin–Nascent Chain Complexes in the Folding of Cytoskeletal Proteins. *J. Cell Biol.* *145*, 265–277 . DOI :10.1083/jcb.145.2.265
- Harris, R.A., and Penington, D.G. (1984). The effects of low-dose vincristine on megakaryocyte colony-forming cells and megakaryocyte ploidy. *Br. J. Haematol.* *57*, 37–48 . DOI :10.1111/j.1365-2141.1984.tb02863.x
- Heijnen, H.F.G., Debili, N., Vainchenker, W., Breton-Gorius, J., Geuze, H.J., and Sixma, J.J. (1998). Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules. *Blood* *91*, 2313–2325 . DOI :10.1182/blood.V91.7.2313
- Hiller, G., and Weber, K. (1978). Radioimmunoassay for tubulin: a quantitative comparison of the tubulin content of different established tissue culture cells and tissues. *Cell* *14*, 795–804 . DOI :10.1016/0092-8674(78)90335-5
- Hitchcock, I.S., and Kaushansky, K. (2014). Thrombopoietin from beginning to end. *Br. J. Haematol.* *165*, 259–268 . DOI :10.1111/bjh.12772
- Hoffmeister, K.M., and Falet, H. (2016). Platelet clearance by the hepatic Ashwell-Morrell receptor: mechanisms and biological significance. *Thromb. Res.* *141 Suppl*, S68–72 . DOI :10.1016/S0049-3848(16)30370-X
- Hohmann, and Dehghani (2019). The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork. *Cells* *8*, 362 . DOI :10.3390/cells8040362
- Holmsen, H., and Weiss, H.J. (1979). Secretable storage pools in platelets. *Annu. Rev. Med.* *30*, 119–134 . DOI :10.1146/annurev.me.30.020179.001003
- Howell, W.H., and Donahue, D.D. (1937). The production of blood platelets in the lungs. *J. Exp. Med.* *65*, 177–203 . DOI :10.1084/jem.65.2.177
- Hoyle, H.D., and Raff, E.C. (1990). Two *Drosophila* beta tubulin isoforms are not functionally equivalent. *J. Cell Biol.* *111*, 1009–1026 . DOI :10.1083/jcb.111.3.1009
- Huang, H., and Cantor, A.B. (2009). Common features of megakaryocytes and hematopoietic stem cells: what's the connection? *J. Cell. Biochem.* *107*, 857–864 . DOI :10.1002/jcb.22184
- Hyman, A.A., Salser, S., Drechsel, D.N., Unwin, N., and Mitchison, T.J. (1992). Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Mol. Biol. Cell* *3*, 1155–1167 . DOI :10.1091/mbc.3.10.1155
- Iancu-Rubin, C., Gajzer, D., Tripodi, J., Najfeld, V., Gordon, R.E., Hoffman, R., and Atweh, G.F. (2011). Down-regulation of stathmin expression is required for megakaryocyte maturation and platelet production. *Blood* *117*, 4580–4589 . DOI :10.1182/blood-2010-09-305540

- Iancu-Rubin, C., Gajzer, D., Mosoyan, G., Feller, F., Mascarenhas, J., and Hoffman, R. (2012). Panobinostat (LBH589)-induced acetylation of tubulin impairs megakaryocyte maturation and platelet formation. *Exp. Hematol.* *40*, 564–574 . DOI :10.1016/j.exphem.2012.02.004
- Ichikawa, M., Asai, T., Saito, T., Seo, S., Yamazaki, I., Yamagata, T., Mitani, K., Chiba, S., Ogawa, S., Kurokawa, M., et al. (2004). AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat. Med.* *10*, 299–304 . DOI :10.1038/nm997
- Ikegami, K., Heier, R.L., Taruishi, M., Takagi, H., Mukai, M., Shimma, S., Taira, S., Hatanaka, K., Morone, N., Yao, I., et al. (2007). Loss of alpha-tubulin polyglutamylation in ROSA22 mice is associated with abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 3213–3218 . DOI :10.1073/pnas.0611547104
- Ikegami, K., Sato, S., Nakamura, K., Ostrowski, L.E., and Setou, M. (2010). Tubulin polyglutamylation is essential for airway ciliary function through the regulation of beating asymmetry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 10490–10495 . DOI :10.1073/pnas.1002128107
- Inoué, S. (2008). The effect of colchicine on the microscopic and submicroscopic structure of the mitotic spindle. In *Collected Works of Shinya Inoué*, (WORLD SCIENTIFIC), pp. 89–102 . DOI :10.1142/9789812790866_0011
- Italiano, J.E., Lecine, P., Shivdasani, R.A., and Hartwig, J.H. (1999). Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J. Cell Biol.* *147*, 1299–1312 . DOI :10.1083/jcb.147.6.1299
- Italiano, J.E., Bergmeier, W., Tiwari, S., Falet, H., Hartwig, J.H., Hoffmeister, K.M., André, P., Wagner, D.D., and Shivdasani, R.A. (2003). Mechanisms and implications of platelet discoid shape. *Blood* *101*, 4789–4796 . DOI :10.1182/blood-2002-11-3491
- Italiano, J.E., Bender, M., Merrill-Skoloff, G., Ghevaert, C., Nieswandt, B., and Flaumenhaft, R. (2021). Microvesicles, but not platelets, bud off from mouse bone marrow megakaryocytes. *Blood* *138*, 1998–2001 . DOI :10.1182/blood.2021012496
- Ito, T., Ishida, Y., Kashiwagi, R., and Kuriya, S.-I. (1996). Recombinant human c-Mpl ligand is not a direct stimulator of proplatelet formation in mature human megakaryocytes. *Br. J. Haematol.* *94*, 387–390 . DOI :10.1046/j.1365-2141.1996.d01-1813.x
- Ito, Y., Nakamura, S., Sugimoto, N., Shigemori, T., Kato, Y., Ohno, M., Sakuma, S., Ito, K., Kumon, H., Hirose, H., et al. (2018). Turbulence Activates Platelet Biogenesis to Enable Clinical Scale Ex Vivo Production. *Cell* *174*, 636–648.e18 . DOI :10.1016/j.cell.2018.06.011
- Jackson, C.W., Arnold, J.T., Pestina, T.I., and Stenberg, P.E. (1997). Megakaryocyte Biology. In *Thrombopoiesis and Thrombopoietins*, D.J. Kuter, P. Hunt, W. Sheridan, and D. Zucker-Franklin, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 3–39 . DOI :10.1007/978-1-4612-3958-1_1
- Jahandideh, B., Derakhshani, M., Abbaszadeh, H., Akbar Movassaghpour, A., Mehdizadeh, A.,

- Talebi, M., and Yousefi, M. (2020). The pro-Inflammatory cytokines effects on mobilization, self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells. *Hum. Immunol.* *81*, 206–217 . DOI :10.1016/j.humimm.2020.01.004
- Janke, C. (2014). The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions. *J. Cell Biol.* *206*, 461–472 . DOI :10.1083/jcb.201406055
- Janke, C., and Magiera, M.M. (2020). The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *21*, 307–326 . DOI :10.1038/s41580-020-0214-3
- Janke, C., and Montagnac, G. (2017). Causes and Consequences of Microtubule Acetylation. *Curr. Biol.* *27*, R1287–R1292 . DOI :10.1016/j.cub.2017.10.044
- Janke, C., Rogowski, K., Wloga, D., Regnard, C., Kajava, A. V., Strub, J.-M., Temurak, N., van Dijk, J., Boucher, D., van Dorsselaer, A., et al. (2005). Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family. *Science* *308*, 1758–1762 . DOI :10.1126/science.1113010
- Jijumon, A.S., Bodakuntla, S., Genova, M., Bangera, M., Sackett, V., Besse, L., Maksut, F., Henriot, V., Magiera, M.M., Sirajuddin, M., et al. (2022). Lysate-based pipeline to characterize microtubule-associated proteins uncovers unique microtubule behaviours. *Nat. Cell Biol.* *24*, 253–267 . DOI :10.1038/s41556-021-00825-4
- Johnson, K.A., and Borisy, G.G. (1977). Kinetic analysis of microtubule self-assembly in vitro. *J. Mol. Biol.* *117*, 1–31 . DOI :10.1016/0022-2836(77)90020-1
- Johnson, G.J., Leis, L.A., Krumwiede, M.D., and White, J.G. (2007). The critical role of myosin IIA in platelet internal contraction. *J. Thromb. Haemost.* *5*, 1516–1529 . DOI :10.1111/j.1538-7836.2007.02611.x
- Junt, T., Schulze, H., Chen, Z., Massberg, S., Goerge, T., Krueger, A., Wagner, D.D., Graf, T., Italiano, J.E., Shivdasani, R.A., et al. (2007). Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* *317*, 1767–1770 . DOI :10.1126/science.1146304
- Jurak Begonja, A., Hoffmeister, K.M., Hartwig, J.H., and Falet, H. (2011). FlnA-null megakaryocytes prematurely release large and fragile platelets that circulate poorly. *Blood* *118*, 2285–2295 . DOI :10.1182/blood-2011-04-348482
- Kahr, W.H.A., Hinckley, J., Li, L., Schwertz, H., Christensen, H., Rowley, J.W., Pluthero, F.G., Urban, D., Fabbro, S., Nixon, B., et al. (2011). Mutations in NBEAL2, encoding a BEACH protein, cause gray platelet syndrome. *Nat. Genet.* *43*, 738–740 . DOI :10.1038/ng.884
- Kahr, W.H.A., Lo, R.W., Li, L., Pluthero, F.G., Christensen, H., Ni, R., Vaezzadeh, N., Hawkins, C.E., Weyrich, A.S., Di Paola, J., et al. (2013). Abnormal megakaryocyte development and platelet function in Nbeal2(-/-) mice. *Blood* *122*, 3349–3358 . DOI :10.1182/blood-2013-04-499491
- Kaiser, B., and Markwardt, F. (1986). Antithrombotic and haemorrhagic effects of synthetic and

naturally occurring thrombin inhibitors. *Thromb. Res.* 43, 613–620 . DOI :10.1016/0049-3848(86)90098-8

- Kalebic, N., Sorrentino, S., Perlas, E., Bolasco, G., Martinez, C., and Heppenstall, P.A. (2013). α TAT1 is the major α -tubulin acetyltransferase in mice. *Nat. Commun.* 4, 1962 . DOI :10.1038/ncomms2962
- Kann, M.-L., Soues, S., Levilliers, N., and Fouquet, J.-P. (2003). Glutamylated tubulin: diversity of expression and distribution of isoforms. *Cell Motil. Cytoskeleton* 55, 14–25 . DOI :10.1002/cm.10107
- Kaul, N., Soppina, V., and Verhey, K.J. (2014). Effects of α -tubulin K40 acetylation and detyrosination on kinesin-1 motility in a purified system. *Biophys. J.* 106, 2636–2643 . DOI :10.1016/j.bpj.2014.05.008
- Kaushansky, K. (2005). The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J. Clin. Invest.* 115, 3339–3347 . DOI :10.1172/JCI26674
- Kautz, J., and De Marsch, Q.B. (1955). Electron microscopy of sectioned blood and bone marrow elements. *Rev. Hematol.* 10, 314–323; discussion, 324–344
- Keeling, P.J., and Doolittle, W.F. (1996). Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family. *Mol. Biol. Evol.* 13, 1297–1305 . DOI :10.1093/oxfordjournals.molbev.a025576
- Kelemen, E., Lehoczky, D., Cserháti, I., Krizsa, F., and Rák, K. (1963). Demonstrability of a Serum Factor Inducing Thrombocytosis Prior to Acute Rises of Platelets in Mice and Men. *Acta Haematol.* 29, 16–26 . DOI :10.1159/000207321
- Kenney, D.M., and Linck, R.W. (1985). The cytoskeleton of unstimulated blood platelets: structure and composition of the isolated marginal microtubular band. *J. Cell Sci.* 78, 1–22 . DOI :10.1242/jcs.78.1.1
- Khan, A.O., Slater, A., Maclachlan, A., Nicolson, P.L.R., Pike, J.A., Reyat, J.S., Yule, J., Stapley, R., Rayes, J., Thomas, S.G., et al. (2022). Post-translational polymodification of β 1-tubulin regulates motor protein localisation in platelet production and function. *Haematologica* 107, 243–259 . DOI :10.3324/haematol.2020.270793
- Khodiyar, V.K., Maltais, L.J., Ruef, B.J., Sneddon, K.M.B., Smith, J.R., Shimoyama, M., Cabral, F., Dumontet, C., Dutcher, S.K., Harvey, R.J., et al. (2007). A revised nomenclature for the human and rodent alpha-tubulin gene family. *Genomics* 90, 285–289 . DOI :10.1016/j.ygeno.2007.04.008
- Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121, 1109–1121 . DOI :10.1016/j.cell.2005.05.026
- Kimmerlin, Q., Dupuis, A., Bodakuntla, S., Weber, C., Heim, V., Henriot, V., Moog, S., Eckly, A.,

- Guéguen, P., Ferec, C., et al. (2022a). Mutations in the most divergent α -tubulin isotype, $\alpha 8$ -tubulin, cause defective platelet biogenesis. *J. Thromb. Haemost.* 20, 461–469 . DOI :10.1111/jth.15573
- Kimmerlin, Q., Strassel, C., Eckly, A., and Lanza, F. (2022b). The tubulin code in platelet biogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* . DOI :10.1016/j.semcdb.2022.01.010
- Kinoshita, K., Arnal, I., Desai, A., Drechsel, D.N., and Hyman, A.A. (2001). Reconstitution of physiological microtubule dynamics using purified components. *Science* 294, 1340–1343 . DOI :10.1126/science.1064629
- Konno, A., Ikegami, K., Konishi, Y., Yang, H.-J., Abe, M., Yamazaki, M., Sakimura, K., Yao, I., Shiba, K., Inaba, K., et al. (2016). *Ttll9*^{-/-} mice sperm flagella show shortening of doublet 7, reduction of doublet 5 polyglutamylolation and a stall in beating. *J. Cell Sci.* 129, 2757–2766 . DOI :10.1242/jcs.185983
- Kowitz, J.D., Linck, R.W., and Kenney, D.M. (1988). Isolated cytoskeletons of human blood platelets: dark-field imaging of coiled and uncoiled microtubules. *Biol. Cell* 64, 283–291 . DOI :10.1016/0248-4900(88)90002-0
- Kreis, T.E. (1987). Microtubules containing detyrosinated tubulin are less dynamic. *EMBO J.* 6, 2597–2606 . DOI :10.1002/j.1460-2075.1987.tb02550.x
- Krendel, M., Zenke, F.T., and Bokoch, G.M. (2002). Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* 4, 294–301 . DOI :10.1038/ncb773
- Kumar, N., and Flavin, M. (1981). Preferential action of a brain detyrosinolytic carboxypeptidase on polymerized tubulin. *J. Biol. Chem.* 256, 7678–7686 . DOI :10.1016/s0021-9258(19)69014-9
- Kunishima, S., Kobayashi, R., Itoh, T.J., Hamaguchi, M., and Saito, H. (2009). Mutation of the beta1-tubulin gene associated with congenital macrothrombocytopenia affecting microtubule assembly. *Blood* 113, 458–461 . DOI :10.1182/blood-2008-06-162610
- Kunishima, S., Nishimura, S., Suzuki, H., Imaizumi, M., and Saito, H. (2014). TUBB1 mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. *Eur. J. Haematol.* 92, 276–282 . DOI :10.1111/ejh.12252
- Kuntamukkula, M.S., Moake, J.L., McIntire, L. V, and Cimo, P.L. (1982). Effects of colchicine and vinblastine on platelet contractility and release. *Thromb. Res.* 26, 329–339 . DOI :10.1016/0049-3848(82)90251-1
- Kuvarina, O.N., Herglotz, J., Kolodziej, S., Kohrs, N., Herkt, S., Wojcik, B., Oellerich, T., Corso, J., Behrens, K., Kumar, A., et al. (2015). RUNX1 represses the erythroid gene expression program during megakaryocytic differentiation. *Blood* 125, 3570–3579 . DOI :10.1182/blood-2014-11-610519

- L'Hernault, S.W., and Rosenbaum, J.L. (1983). Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified in the flagella during flagellar assembly. *J. Cell Biol.* 97, 258–263 . DOI :10.1083/jcb.97.1.258
- Lacroix, B., van Dijk, J., Gold, N.D., Guizetti, J., Aldrian-Herrada, G., Rogowski, K., Gerlich, D.W., and Janke, C. (2010). Tubulin polyglutamylolation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J. Cell Biol.* 189, 945–954 . DOI :10.1083/jcb.201001024
- Lalo, U., Jones, S., Roberts, J.A., Mahaut-Smith, M.P., and Evans, R.J. (2012). Heat shock protein 90 inhibitors reduce trafficking of ATP-gated P2X₁ receptors and human platelet responsiveness. *J. Biol. Chem.* 287, 32747–32754 . DOI :10.1074/jbc.M112.376566
- Landskron, L., Bak, J., Adamopoulos, A., Kaplani, K., Moraiti, M., van den Hengel, L.G., Song, J.-Y., Bleijerveld, O.B., Nieuwenhuis, J., Heidebrecht, T., et al. (2022). Posttranslational modification of microtubules by the MATCAP de tyrosinase. *Science* 6020, eabn6020 . DOI :10.1126/science.abn6020
- Latremoliere, A., Cheng, L., DeLisle, M., Wu, C., Chew, S., Hutchinson, E.B., Sheridan, A., Alexandre, C., Latremoliere, F., Sheu, S.-H., et al. (2018). Neuronal-Specific TUBB3 Is Not Required for Normal Neuronal Function but Is Essential for Timely Axon Regeneration. *Cell Rep.* 24, 1865–1879.e9 . DOI :10.1016/j.celrep.2018.07.029
- Lazzari, L., Henschler, R., Lecchi, L., Rebull, P., Mertelsmann, R., and Sirchia, G. (2000). Interleukin-6 and interleukin-11 act synergistically with thrombopoietin and stem cell factor to modulate ex vivo expansion of human CD41+ and CD61+ megakaryocytic cells. *Haematologica* 85, 25–30
- Leandro-García, L.J., Leskelä, S., Landa, I., Montero-Conde, C., López-Jiménez, E., Letón, R., Cascón, A., Robledo, M., and Rodríguez-Antona, C. (2010). Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isoforms. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 67, 214–223 . DOI :10.1002/cm.20436
- Leary, A., Sim, S., Nazarova, E., Shulist, K., Genthial, R., Yang, S.K., Bui, K.H., Francois, P., and Vogel, J. (2019). Successive Kinesin-5 Microtubule Crosslinking and Sliding Promote Fast, Irreversible Formation of a Stereotyped Bipolar Spindle. *Curr. Biol.* 29, 3825–3837.e3 . DOI :10.1016/j.cub.2019.09.030
- Lecine, P., Italiano, J.E., Kim, S.W., Villeval, J.L., and Shivdasani, R.A. (2000). Hematopoietic-specific beta 1 tubulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2. *Blood* 96, 1366–1373 . DOI :10.1182/blood.v96.4.1366.h8001366_1366_1373
- Ledbetter, M.C., and Porter, K.R. (1963). A “Microtubule” In Plant Cell Fine Structure. *J. Cell Biol.* 19, 239–250 . DOI :10.1083/jcb.19.1.239
- LeDizet, M., and Piperno, G. (1986). Cytoplasmic microtubules containing acetylated alpha-tubulin in *Chlamydomonas reinhardtii*: spatial arrangement and properties. *J. Cell Biol.* 103, 13–22 . DOI :10.1083/jcb.103.1.13

- LeDizet, M., and Piperno, G. (1987). Identification of an acetylation site of Chlamydomonas alpha-tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 5720–5724 . DOI :10.1073/pnas.84.16.5720
- Lefrançois, E., Ortiz-Muñoz, G., Caudrillier, A., Mallavia, B., Liu, F., Sayah, D.M., Thornton, E.E., Headley, M.B., David, T., Coughlin, S.R., et al. (2017). The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* *544*, 105–109 . DOI :10.1038/nature21706
- LeGuenec, M., Klena, N., Aeschlimann, G., Hamel, V., and Guichard, P. (2021). Overview of the centriole architecture. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *66*, 58–65 . DOI :10.1016/j.sbi.2020.09.015
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* *86*, 973–983 . DOI :10.1016/S0092-8674(00)80172-5
- Léon, C., Hechler, B., Freund, M., Eckly, A., Vial, C., Ohlmann, P., Dierich, A., LeMeur, M., Cazenave, J.P., and Gachet, C. (1999). Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. *J. Clin. Invest.* *104*, 1731–1737 . DOI :10.1172/JCI8399
- Léon, C., Eckly, A., Hechler, B., Aleil, B., Freund, M., Ravanat, C., Jourdain, M., Nonne, C., Weber, J., Tiedt, R., et al. (2007). Megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation dramatically affects hemostasis while preserving platelet aggregation and secretion. *Blood* *110*, 3183–3191 . DOI :10.1182/blood-2007-03-080184
- Léon, C., Evert, K., Dombrowski, F., Pertuy, F., Eckly, A., Laeuffer, P., Gachet, C., and Greinacher, A. (2012). Romiplostim administration shows reduced megakaryocyte response-capacity and increased myelofibrosis in a mouse model of MYH9-RD. *Blood* *119*, 3333–3341 . DOI :10.1182/blood-2011-08-373811
- Leung, C.L., Sun, D., Zheng, M., Knowles, D.R., and Liem, R.K.H. (1999a). Microtubule actin cross-linking factor (MACF): a hybrid of dystonin and dystrophin that can interact with the actin and microtubule cytoskeletons. *J. Cell Biol.* *147*, 1275–1286 . DOI :10.1083/jcb.147.6.1275
- Leung, C.L., Sun, D., and Liem, R.K.H. (1999b). The intermediate filament protein peripherin is the specific interaction partner of mouse BPAG1-n (dystonin) in neurons. *J. Cell Biol.* *144*, 435–446 . DOI :10.1083/jcb.144.3.435
- Levine, R.F., Hazzard, K.C., and Lamberg, J.D. (1982). The significance of megakaryocyte size. *Blood* *60*, 1122–1131 . DOI :10.1182/blood.V60.5.1122.1122
- Lewis, S.A., Gu, W., and Cowan, N.J. (1987). Free intermingling of mammalian beta-tubulin isoforms among functionally distinct microtubules. *Cell* *49*, 539–548 . DOI :10.1016/0092-8674(87)90456-9
- Lewis, S.A., Tian, G., and Cowan, N.J. (1997). The alpha- and beta-tubulin folding pathways. *Trends Cell Biol.* *7*, 479–484 . DOI :10.1016/S0962-8924(97)01168-9

- Lhermusier, T., Chap, H., and Payrastre, B. (2011). Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *J. Thromb. Haemost.* 9, 1883–1891 . DOI :10.1111/j.1538-7836.2011.04478.x
- Li, R. (2019). The Glycoprotein Ib-IX-V Complex. In *Platelets (Fourth Edition)*, A.D. Michelson, M. Cattaneo, A.L. Frelinger, and P.J. Newman, eds. (London: Elsevier), pp. 193–211 . DOI :10.1016/B978-0-12-813456-6.00010-2
- Li, Z., Kim, E.S., and Bearer, E.L. (2002). Arp2/3 complex is required for actin polymerization during platelet shape change. *Blood* 99, 4466–4474 . DOI :10.1182/blood.v99.12.4466
- Li, Z., Delaney, M.K., O'Brien, K.A., and Du, X. (2010). Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 2341–2349 . DOI :10.1161/ATVBAHA.110.207522
- Liang, J., Xia, L., Oyang, L., Lin, J., Tan, S., Yi, P., Han, Y., Luo, X., Wang, H., Tang, L., et al. (2020). The functions and mechanisms of prefoldin complex and prefoldin-subunits. *Cell Biosci.* 10, 87 . DOI :10.1186/s13578-020-00446-8
- Lin, Z., Gasic, I., Chandrasekaran, V., Peters, N., Shao, S., Mitchison, T.J., and Hegde, R.S. (2020). TTC5 mediates autoregulation of tubulin via mRNA degradation. *Science (80-.)*. 367, 100–104 . DOI :10.1126/science.aaz4352
- Lo, R.W., Li, L., Leung, R., Pluthero, F.G., and Kahr, W.H.A. (2018). NBEAL2 (Neurobeachin-Like 2) Is Required for Retention of Cargo Proteins by α -Granules During Their Production by Megakaryocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38, 2435–2447 . DOI :10.1161/ATVBAHA.118.311270
- Loeffler, D., and Schroeder, T. (2021). Symmetric and asymmetric activation of hematopoietic stem cells. *Curr. Opin. Hematol.* 28, 262–268 . DOI :10.1097/MOH.0000000000000644
- Lok, S., Kaushansky, K., Holly, R.D., Kuijper, J.L., Lofton-Day, C.E., Oort, P.J., Grant, F.J., Heipel, M.D., Burkhead, S.K., and Kramer, J.M. (1994). Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* 369, 565–568 . DOI :10.1038/369565a0
- van der Loo, B., Hong, Y., Hancock, V., Martin, J.F., and Erusalimsky, J.D. (1993). Antimicrotubule agents induce polyploidization of human leukaemic cell lines with megakaryocytic features. *Eur. J. Clin. Invest.* 23, 621–629 . DOI :10.1111/j.1365-2362.1993.tb00723.x
- Lordier, L., Bluteau, D., Jalil, A., Legrand, C., Pan, J., Rameau, P., Jouni, D., Bluteau, O., Mercher, T., Leon, C., et al. (2012a). RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat. Commun.* 3, 717 . DOI :10.1038/ncomms1704
- Lordier, L., Pan, J., Naim, V., Jalil, A., Badirou, I., Rameau, P., Larghero, J., Debili, N., Rosselli, F., Vainchenker, W., et al. (2012b). Presence of a defect in karyokinesis during megakaryocyte

endomitosis. *Cell Cycle* 11, 4385–4389 . DOI :10.4161/cc.22712

Ludueña, R.F., and Banerjee, A. (2009). The Isotypes of Tubulin. In *The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology*, (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 123–175 . DOI :10.1007/978-1-59745-336-3_6

Machlus, K.R., Thon, J.N., and Italiano, J.E. (2014). Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: a review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation. *Br. J. Haematol.* 165, 227–236 . DOI :10.1111/bjh.12758

MacLean, A.L., Lo Celso, C., and Stumpf, M.P.H. (2017). Concise Review: Stem Cell Population Biology: Insights from Hematopoiesis. *Stem Cells* 35, 80–88 . DOI :10.1002/stem.2508

Magiera, M.M., Bodakuntla, S., Žiak, J., Lacomme, S., Marques Sousa, P., Leboucher, S., Hausrat, T.J., Bosc, C., Andrieux, A., Kneussel, M., et al. (2018). Excessive tubulin polyglutamylation causes neurodegeneration and perturbs neuronal transport. *EMBO J.* 37, 1–14 . DOI :10.15252/embj.2018100440

Mahaut-Smith, M.P., Thomas, D., Higham, A.B., Usher-Smith, J.A., Hussain, J.F., Martinez-Pinna, J., Skepper, J.N., and Mason, M.J. (2003). Properties of the demarcation membrane system in living rat megakaryocytes. *Biophys. J.* 84, 2646–2654 . DOI :10.1016/S0006-3495(03)75070-X

Mammadova-Bach, E., Zigrino, P., Brucker, C., Bourdon, C., Freund, M., De Arcangelis, A., Abrams, S.I., Orend, G., Gachet, C., and Mangin, P.H. (2016). Platelet integrin $\alpha 6 \beta 1$ controls lung metastasis through direct binding to cancer cell-derived ADAM9. *JCI Insight* 1, e88245 . DOI :10.1172/jci.insight.88245

Mancini, E., Sanjuan-Pla, A., Luciani, L., Moore, S., Grover, A., Zay, A., Rasmussen, K.D., Luc, S., Bilbao, D., O’Carroll, D., et al. (2012). FOG-1 and GATA-1 act sequentially to specify definitive megakaryocytic and erythroid progenitors. *EMBO J.* 31, 351–365 . DOI :10.1038/emboj.2011.390

Mangin, P., Nonne, C., Eckly, A., Ohlmann, P., Freund, M., Nieswandt, B., Cazenave, J.P., Gachet, C., and Lanza, F. (2003). A PLC gamma 2-independent platelet collagen aggregation requiring functional association of GPVI and integrin $\alpha 2 \beta 1$. *FEBS Lett.* 542, 53–59 . DOI :10.1016/s0014-5793(03)00337-5

Mason, K.D., Carpinelli, M.R., Fletcher, J.I., Collinge, J.E., Hilton, A.A., Ellis, S., Kelly, P.N., Ekert, P.G., Metcalf, D., Roberts, A.W., et al. (2007). Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* 128, 1173–1186 . DOI :10.1016/j.cell.2007.01.037

Mathur, A., Correia, S.R., Dmitrieff, S., Gibeaux, R., Kalinina, I., Quidwai, T., Ries, J., Nedelec, F., and Alhogbi, B.G. (2017). Cytoskeleton mechanics determine resting size and activation dynamics of platelets. *BioRxiv* . DOI :10.1101/413377

Mathur, A., Correia, S.R., Dmitrieff, S., Gibeaux, R., Kalinina, I., Quidwai, T., Ries, J., and Nedelec, F. (2018). Cytoskeleton mechanics determine resting size and activation dynamics of

platelets. *BioRxiv* . DOI :10.1101/413377

- Matsumura, T., Nakamura-Ishizu, A., Takaoka, K., Maki, H., Muddineni, S.S.N.A., Wang, C.Q., Suzushima, H., Kawakita, M., Asou, N., Matsuoka, M., et al. (2019). TUBB1 dysfunction in inherited thrombocytopenia causes genome instability. *Br. J. Haematol.* *185*, 888–902 . DOI :10.1111/bjh.15835
- Mattia, G., Vulcano, F., Milazzo, L., Barca, A., Macioce, G., Giampaolo, A., and Hassan, H.J. (2002). Different ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD34+ cells are correlated with different levels of platelet release. *Blood* *99*, 888–897 . DOI :10.1182/blood.v99.3.888
- Maynard, D.M., Heijnen, H.F.G., Horne, M.K., White, J.G., and Gahl, W.A. (2007). Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry. *J. Thromb. Haemost.* *5*, 1945–1955 . DOI :10.1111/j.1538-7836.2007.02690.x
- Mazzarello, P., Calligaro, A.L., and Calligaro, A. (2001). Giulio Bizzozzero: a pioneer of cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 776–781 . DOI :10.1038/35096085
- Mazzi, S., Lordier, L., Debili, N., Raslova, H., and Vainchenker, W. (2018). Megakaryocyte and polyploidization. *Exp. Hematol.* *57*, 1–13 . DOI :10.1016/j.exphem.2017.10.001
- McElroy, P.L., Wei, P., Buck, K., Sinclair, A.M., Eschenberg, M., Sasu, B., and Molineux, G. (2015). Romiplostim promotes platelet recovery in a mouse model of multicycle chemotherapy-induced thrombocytopenia. *Exp. Hematol.* *43*, 479–487 . DOI :10.1016/j.exphem.2015.02.004
- McKenney, R.J., Huynh, W., Vale, R.D., and Sirajuddin, M. (2016). Tyrosination of α -tubulin controls the initiation of processive dynein-dynactin motility. *EMBO J.* *35*, 1175–1185 . DOI :10.15252/embj.201593071
- McQuillen, R., and Xiao, J. (2020). Insights into the Structure, Function, and Dynamics of the Bacterial Cytokinetic FtsZ-Ring. *Annu. Rev. Biophys.* *49*, 309–341 . DOI :10.1146/annurev-biophys-121219-081703
- Medvinsky, A., and Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* *86*, 897–906 . DOI :10.1016/s0092-8674(00)80165-8
- van der Meijden, P.E.J., and Heemskerk, J.W.M. (2019). Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat. Rev. Cardiol.* *16*, 166–179 . DOI :10.1038/s41569-018-0110-0
- Menéndez, M., Rivas, G., Díaz, J.F., and Andreu, J.M. (1998). Control of the structural stability of the tubulin dimer by one high affinity bound magnesium ion at nucleotide N-site. *J. Biol. Chem.* *273*, 167–176 . DOI :10.1074/jbc.273.1.167
- Messaoudi, K., Ali, A., Ishaq, R., Palazzo, A., Sliwa, D., Bluteau, O., Souquère, S., Muller, D., Diop, K.M., Rameau, P., et al. (2017). Critical role of the HDAC6-cortactin axis in human

- megakaryocyte maturation leading to a proplatelet-formation defect. *Nat. Commun.* 8, 1786 . DOI :10.1038/s41467-017-01690-2
- Millington-Burgess, S.L., and Harper, M.T. (2021). Cytosolic and mitochondrial Ca²⁺ signaling in procoagulant platelets. *Platelets* 32, 855–862 . DOI :10.1080/09537104.2021.1881951
- Minoura, I., Hachikubo, Y., Yamakita, Y., Takazaki, H., Ayukawa, R., Uchimura, S., and Muto, E. (2013). Overexpression, purification, and functional analysis of recombinant human tubulin dimer. *FEBS Lett.* 587, 3450–3455 . DOI :10.1016/j.febslet.2013.08.032
- Mitchell, J.A., Ali, F., Bailey, L., Moreno, L., and Harrington, L.S. (2008). Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp. Physiol.* 93, 141–147 . DOI :10.1113/expphysiol.2007.038588
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237–242 . DOI :10.1038/312237a0
- Mitra, A., Meißner, L., Gandhimathi, R., Renger, R., Ruhnnow, F., and Diez, S. (2020). Kinesin-14 motors drive a right-handed helical motion of antiparallel microtubules around each other. *Nat. Commun.* 11, 1–11 . DOI :10.1038/s41467-020-16328-z
- Modderman, P.W., Admiraal, L.G., Sonnenberg, A., and von dem Borne, A.E. (1992). Glycoproteins V and Ib-IX form a noncovalent complex in the platelet membrane. *J. Biol. Chem.* 267, 364–369 . DOI :10.1016/s0021-9258(18)48503-1
- Mody, N.A., Lomakin, O., Doggett, T.A., Diacovo, T.G., and King, M.R. (2005). Mechanics of transient platelet adhesion to von Willebrand factor under flow. *Biophys. J.* 88, 1432–1443 . DOI :10.1529/biophysj.104.047001
- Mohri, H. (1968). Amino-acid composition of “Tubulin” constituting microtubules of sperm flagella. *Nature* 217, 1053–1054 . DOI :10.1038/2171053a0
- Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A., and Kan, Y.W. (1994). Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 9926–9930 . DOI :10.1073/pnas.91.21.9926
- Monahan-Earley, R., Dvorak, A.M., and Aird, W.C. (2013). Evolutionary origins of the blood vascular system and endothelium. *J. Thromb. Haemost.* 11 Suppl 1, 46–66 . DOI :10.1111/jth.12253
- Montenont, E., Bhatlekar, S., Jacob, S., Kosaka, Y., Manne, B.K., Lee, O., Parra-Izquierdo, I., Tugolukova, E., Tolley, N.D., Rondina, M.T., et al. (2021). CRISPR-edited megakaryocytes for rapid screening of platelet gene functions. *Blood Adv.* 5, 2362–2374 . DOI :10.1182/bloodadvances.2020004112
- Morley, S.J., Qi, Y., Iovino, L., Andolfi, L., Guo, D., Kalebic, N., Castaldi, L., Tischer, C., Portulano, C., Bolasco, G., et al. (2016). Acetylated tubulin is essential for touch sensation in mice. *Elife*

5 . DOI :10.7554/eLife.20813

- Morowski, M., Vögtle, T., Kraft, P., Kleinschnitz, C., Stoll, G., and Nieswandt, B. (2013). Only severe thrombocytopenia results in bleeding and defective thrombus formation in mice. *Blood* *121*, 4938–4947 . DOI :10.1182/blood-2012-10-461459
- Mühlethaler, T., Gioia, D., Prota, A.E., Sharpe, M.E., Cavalli, A., and Steinmetz, M.O. (2021). Comprehensive Analysis of Binding Sites in Tubulin. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *60*, 13331–13342 . DOI :10.1002/anie.202100273
- Mullen, R.J., Eicher, E.M., and Sidman, R.L. (1976). Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *73*, 208–212 . DOI :10.1073/pnas.73.1.208
- Murone, M., Carpenter, D.A., and de Sauvage, F.J. (1998). Hematopoietic deficiencies in c-mpl and TPO knockout mice. *Stem Cells* *16*, 1–6 . DOI :10.1002/stem.160001
- Nachmias, V.T. (1980). Cytoskeleton of human platelets at rest and after spreading. *J. Cell Biol.* *86*, 795–802 . DOI :10.1083/jcb.86.3.795
- Nakata, T., and Hirokawa, N. (1987). Cytoskeletal reorganization of human platelets after stimulation revealed by the quick-freeze deep-etch technique. *J. Cell Biol.* *105*, 1771–1780 . DOI :10.1083/jcb.105.4.1771
- Nakorn, T.N., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2003). Characterization of mouse clonogenic megakaryocyte progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 205–210 . DOI :10.1073/pnas.262655099
- Nielsen, M.G., Gadagkar, S.R., and Gutzwiller, L. (2010). Tubulin evolution in insects: gene duplication and subfunctionalization provide specialized isoforms in a functionally constrained gene family. *BMC Evol. Biol.* *10*, 113 . DOI :10.1186/1471-2148-10-113
- Nieswandt, B., Varga-Szabo, D., and Elvers, M. (2009). Integrins in platelet activation. *J. Thromb. Haemost.* *7 Suppl 1*, 206–209 . DOI :10.1111/j.1538-7836.2009.03370.x
- Nieuwenhuis, J., Adamopoulos, A., Bleijerveld, O.B., Mazouzi, A., Stickel, E., Celie, P., Altelaar, M., Knipscheer, P., Perrakis, A., Blomen, V.A., et al. (2017). Vasohibins encode tubulin detyrosinating activity. *Science* *358*, 1453–1456 . DOI :10.1126/science.aao5676
- Ninos, J.M., Jefferies, L.C., Cogle, C.R., and Kerr, W.G. (2006). The thrombopoietin receptor, c-Mpl, is a selective surface marker for human hematopoietic stem cells. *J. Transl. Med.* *4*, 9 . DOI :10.1186/1479-5876-4-9
- Nirschl, J.J., Magiera, M.M., Lazarus, J.E., Janke, C., and Holzbaur, E.L.F. (2016). α -Tubulin Tyrosination and CLIP-170 Phosphorylation Regulate the Initiation of Dynein-Driven Transport in Neurons. *Cell Rep.* *14*, 2637–2652 . DOI :10.1016/j.celrep.2016.02.046
- Nishikii, H., Kanazawa, Y., Umemoto, T., Goltsev, Y., Matsuzaki, Y., Matsushita, K., Yamato, M., Nolan, G.P., Negrin, R., and Chiba, S. (2015). Unipotent Megakaryopoietic Pathway Bridging

- Hematopoietic Stem Cells and Mature Megakaryocytes. *Stem Cells* 33, 2196–2207 . DOI :10.1002/stem.1985
- Nithianantham, S., Le, S., Seto, E., Jia, W., Leary, J., Corbett, K.D., Moore, J.K., and Al-Bassam, J. (2015). Tubulin cofactors and Arl2 are cage-like chaperones that regulate the soluble $\alpha\beta$ -tubulin pool for microtubule dynamics. *Elife* 4, 1–33 . DOI :10.7554/eLife.08811
- Nogales, E., Wolf, S.G., and Downing, K.H. (1998). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391, 199–203 . DOI :10.1038/34465
- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A., and Downing, K.H. (1999). High-Resolution Model of the Microtubule. *Cell* 96, 79–88 . DOI :10.1016/S0092-8674(00)80961-7
- Notta, F., Doulatov, S., Laurenti, E., Poeppl, A., Jurisica, I., and Dick, J.E. (2011). Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science* 333, 218–221 . DOI :10.1126/science.1201219
- Notta, F., Zandi, S., Takayama, N., Dobson, S., Gan, O.I., Wilson, G., Kaufmann, K.B., McLeod, J., Laurenti, E., Dunant, C.F., et al. (2016). Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science* 351, aab2116 . DOI :10.1126/science.aab2116
- Nurden, A.T., and Nurden, P. (2007). The gray platelet syndrome: clinical spectrum of the disease. *Blood Rev.* 21, 21–36 . DOI :10.1016/j.blre.2005.12.003
- Oakley, C.E., and Oakley, B.R. (1989). Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* 338, 662–664 . DOI :10.1038/338662a0
- Oddoux, S., Zaal, K.J., Tate, V., Kenea, A., Nandkeolyar, S.A., Reid, E., Liu, W., and Ralston, E. (2013). Microtubules that form the stationary lattice of muscle fibers are dynamic and nucleated at Golgi elements. *J. Cell Biol.* 203, 205–213 . DOI :10.1083/jcb.201304063
- Olmsted, J.B., and Borisy, G.G. (1975). Ionic and nucleotide requirements for microtubule polymerization in vitro. *Biochemistry* 14, 2996–3005 . DOI :10.1021/bio0684a032
- Ortmann, C.A., Kent, D.G., Nangalia, J., Silber, Y., Wedge, D.C., Grinfeld, J., Baxter, E.J., Massie, C.E., Papaemmanuil, E., Menon, S., et al. (2015). Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* 372, 601–612 . DOI :10.1056/NEJMoa1412098
- Pachter, J.S., Yen, T.J., and Cleveland, D.W. (1987). Autoregulation of tubulin expression is achieved through specific degradation of polysomal tubulin mRNAs. *Cell* 51, 283–292 . DOI :10.1016/0092-8674(87)90155-3
- Pagnamenta, A.T., Heemeryck, P., Martin, H.C., Bosc, C., Peris, L., Uszynski, I., Gory-Fauré, S., Couly, S., Deshpande, C., Siddiqui, A., et al. (2019). Defective tubulin detyrosination causes structural brain abnormalities with cognitive deficiency in humans and mice. *Hum. Mol. Genet.* 28, 3391–3405 . DOI :10.1093/hmg/ddz186

- Palma-Barqueros, V., Bury, L., Kunishima, S., Lozano, M.L., Rodríguez-Alen, A., Revilla, N., Bohdan, N., Padilla, J., Fernández-Pérez, M.P., de la Morena-Barrio, M.E., et al. (2021). Expanding the genetic spectrum of TUBB1-related thrombocytopenia. *Blood Adv.* 5, 5453–5467 . DOI :10.1182/bloodadvances.2020004057
- Palta, S., Saroa, R., and Palta, A. (2014). Overview of the coagulation system. *Indian J. Anaesth.* 58, 515–523 . DOI :10.4103/0019-5049.144643
- Pamula, M.C., Ti, S.-C., and Kapoor, T.M. (2016). The structured core of human β tubulin confers isotype-specific polymerization properties. *J. Cell Biol.* 213, 425–433 . DOI :10.1083/jcb.201603050
- Panteleev, M.A., Korin, N., Reesink, K.D., Bark, D.L., Cosemans, J.M.E.M., Gardiner, E.E., and Mangin, P.H. (2021). Wall shear rates in human and mouse arteries: Standardization of hemodynamics for in vitro blood flow assays: Communication from the ISTH SSC subcommittee on biorheology. *J. Thromb. Haemost.* 19, 588–595 . DOI :10.1111/jth.15174
- Park, I.Y., Powell, R.T., Tripathi, D.N., Dere, R., Ho, T.H., Blasius, T.L., Chiang, Y.-C., Davis, I.J., Fahey, C.C., Hacker, K.E., et al. (2016). Dual Chromatin and Cytoskeletal Remodeling by SETD2. *Cell* 166, 950–962 . DOI :10.1016/j.cell.2016.07.005
- Patel-Hett, S., Richardson, J.L., Schulze, H., Drabek, K., Isaac, N.A., Hoffmeister, K., Shivdasani, R.A., Bulinski, J.C., Galjart, N., Hartwig, J.H., et al. (2008). Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules. *Blood* 111, 4605–4616 . DOI :10.1182/blood-2007-10-118844
- Patel, S.R., Richardson, J.L., Schulze, H., Kahle, E., Galjart, N., Drabek, K., Shivdasani, R.A., Hartwig, J.H., and Italiano, J.E. (2005). Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood* 106, 4076–4085 . DOI :10.1182/blood-2005-06-2204
- Paturle-Lafanechère, L., Eddé, B., Denoulet, P., Van Dorsselaer, A., Mazarguil, H., Le Caer, J.P., Wehland, J., and Job, D. (1991). Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochemistry* 30, 10523–10528 . DOI :10.1021/bio0107a022
- Paturle-Lafanechère, L., Manier, M., Trigault, N., Pirolet, F., Mazarguil, H., and Job, D. (1994). Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J. Cell Sci.* 107 (Pt 6, 1529–1543 . DOI :10.1242/jcs.107.6.1529
- Pekny, M., and Lane, E.B. (2007). Intermediate filaments and stress. *Exp. Cell Res.* 313, 2244–2254 . DOI :10.1016/j.yexcr.2007.04.023
- Peris, L., They, M., Fauré, J., Saoudi, Y., Lafanechère, L., Chilton, J.K., Gordon-Weeks, P., Galjart, N., Bornens, M., Wordeman, L., et al. (2006). Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J. Cell Biol.* 174, 839–849 . DOI :10.1083/jcb.200512058

- Peris, L., Wagenbach, M., Lafanechère, L., Brocard, J., Moore, A.T., Kozielski, F., Job, D., Wordeman, L., and Andrieux, A. (2009). Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J. Cell Biol.* *185*, 1159–1166 . DOI :10.1083/jcb.200902142
- Pietras, E.M., Reynaud, D., Kang, Y.-A., Carlin, D., Calero-Nieto, F.J., Leavitt, A.D., Stuart, J.M., Göttgens, B., and Passegué, E. (2015). Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell* *17*, 35–46 . DOI :10.1016/j.stem.2015.05.003
- Piperno, G., and Fuller, M.T. (1985). Monoclonal antibodies specific for an acetylated form of alpha-tubulin recognize the antigen in cilia and flagella from a variety of organisms. *J. Cell Biol.* *101*, 2085–2094 . DOI :10.1083/jcb.101.6.2085
- Pleines, I., Hagedorn, I., Gupta, S., May, F., Chakarova, L., van Hengel, J., Offermanns, S., Krohne, G., Kleinschnitz, C., Brakebusch, C., et al. (2012). Megakaryocyte-specific RhoA deficiency causes macrothrombocytopenia and defective platelet activation in hemostasis and thrombosis. *Blood* *119*, 1054–1063 . DOI :10.1182/blood-2011-08-372193
- Portran, D., Schaedel, L., Xu, Z., Théry, M., and Nachury, M. V. (2017). Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. *Nat. Cell Biol.* *19*, 391–398 . DOI :10.1038/ncb3481
- Potts, K.S., Sargeant, T.J., Markham, J.F., Shi, W., Biben, C., Josefsson, E.C., Whitehead, L.W., Rogers, K.L., Liakhovitskaia, A., Smyth, G.K., et al. (2014). A lineage of diploid platelet-forming cells precedes polyploid megakaryocyte formation in the mouse embryo. *Blood* *124*, 2725–2729 . DOI :10.1182/blood-2014-02-559468
- Potts, K.S., Farley, A., Dawson, C.A., Rimes, J., Biben, C., de Graaf, C., Potts, M.A., Stonehouse, O.J., Carmagnac, A., Gangatirkar, P., et al. (2020). Membrane budding is a major mechanism of in vivo platelet biogenesis. *J. Exp. Med.* *217* . DOI :10.1084/jem.20191206
- Poujol, C., Ware, J., Nieswandt, B., Nurden, A.T., and Nurden, P. (2002). Absence of GPIIb/IIIa is responsible for aberrant membrane development during megakaryocyte maturation: ultrastructural study using a transgenic model. *Exp. Hematol.* *30*, 352–360 . DOI :10.1016/s0301-472x(02)00774-9
- Pronk, C.J.H., Rossi, D.J., Månsson, R., Attema, J.L., Norddahl, G.L., Chan, C.K.F., Sigvardsson, M., Weissman, I.L., and Bryder, D. (2007). Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy. *Cell Stem Cell* *1*, 428–442 . DOI :10.1016/j.stem.2007.07.005
- Qian, H., Buza-Vidas, N., Hyland, C.D., Jensen, C.T., Antonchuk, J., Månsson, R., Thoren, L.A., Ekblom, M., Alexander, W.S., and Jacobsen, S.E.W. (2007). Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* *1*, 671–684 . DOI :10.1016/j.stem.2007.10.008
- Radley, J.M., and Haller, C.J. (1982). The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood* *60*, 213–219 . DOI :10.1182/blood.V60.1.213.213

- Raslova, H., Roy, L., Vourc'h, C., Le Couedic, J.P., Brison, O., Metivier, D., Feunteun, J., Kroemer, G., Debili, N., and Vainchenker, W. (2003). Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification. *Blood* 101, 541–544 . DOI :10.1182/blood-2002-05-1553
- Raybin, D., and Flavin, M. (1975). An enzyme tyrosylating alpha-tubulin and its role in microtubule assembly. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 1088–1095 . DOI :10.1016/s0006-291x(75)80497-9
- Reddy, E.C., and Rand, M.L. (2020). Procoagulant Phosphatidylserine-Exposing Platelets in vitro and in vivo. *Front. Cardiovasc. Med.* 7, 15 . DOI :10.3389/fcvm.2020.00015
- Redeker, V., Levilliers, N., Schmitter, J.M., Le Caer, J.P., Rossier, J., Adoutte, A., and Bré, M.H. (1994). Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science* 266, 1688–1691 . DOI :10.1126/science.7992051
- Regnard, C., Audebert, S., Desbruyères, Denoulet, P., and Eddé, B. (1998). Tubulin polyglutamylase: partial purification and enzymatic properties. *Biochemistry* 37, 8395–8404 . DOI :10.1021/bi9804131
- Regnard, C., Fesquet, D., Janke, C., Boucher, D., Desbruyères, E., Koulakoff, A., Insina, C., Travo, P., and Eddé, B. (2003). Characterisation of PGs1, a subunit of a protein complex co-purifying with tubulin polyglutamylase. *J. Cell Sci.* 116, 4181–4190 . DOI :10.1242/jcs.00743
- Ribba, A.-S., Batzenschlager, M., Rabat, C., Buchou, T., Moog, S., Khochbin, S., Bourova-Flin, E., Lafanechère, L., Lanza, F., and Sadoul, K. (2021). Marginal band microtubules are acetylated by α TAT1. *Platelets* 32, 568–572 . DOI :10.1080/09537104.2020.1759791
- Richardson, J.L., Shivdasani, R.A., Boers, C., Hartwig, J.H., and Italiano, J.E. (2005). Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood* 106, 4066–4075 . DOI :10.1182/blood-2005-06-2206
- Riddel, J.P., Aouizerat, B.E., Miaskowski, C., and Lillicrap, D.P. (2007). Theories of blood coagulation. *J. Pediatr. Oncol. Nurs.* 24, 123–131 . DOI :10.1177/1043454206298693
- Robison, P., Caporizzo, M.A., Ahmadzadeh, H., Bogush, A.I., Chen, C.Y., Margulies, K.B., Shenoy, V.B., and Prosser, B.L. (2016). Detyrosinated microtubules buckle and bear load in contracting cardiomyocytes. *Science* 352, aaf0659 . DOI :10.1126/science.aaf0659
- Rocha, C., Papon, L., Cacheux, W., Marques Sousa, P., Lascano, V., Tort, O., Giordano, T., Vacher, S., Lemmers, B., Mariani, P., et al. (2014). Tubulin glycyloses are required for primary cilia, control of cell proliferation and tumor development in colon. *EMBO J.* 33, 2735–2735 . DOI :10.15252/embj.201490279
- Rodriguez-Fraticelli, A.E., Wolock, S.L., Weinreb, C.S., Panero, R., Patel, S.H., Jankovic, M., Sun, J., Calogero, R.A., Klein, A.M., and Camargo, F.D. (2018). Clonal analysis of lineage fate in native haematopoiesis. *Nature* 553, 212–216 . DOI :10.1038/nature25168
- Rogowski, K., Juge, F., van Dijk, J., Wloga, D., Strub, J.-M., Levilliers, N., Thomas, D., Bré, M.-H.,

- Van Dorsselaer, A., Gaertig, J., et al. (2009). Evolutionary divergence of enzymatic mechanisms for posttranslational polyglycylation. *Cell* 137, 1076–1087 . DOI :10.1016/j.cell.2009.05.020
- Rogowski, K., van Dijk, J., Magiera, M.M., Bosc, C., Deloulme, J.-C., Bosson, A., Peris, L., Gold, N.D., Lacroix, B., Bosch Grau, M., et al. (2010). A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell* 143, 564–578 . DOI :10.1016/j.cell.2010.10.014
- Roos, J., Hummel, T., Ng, N., Klämbt, C., and Davis, G.W. (2000). *Drosophila* Futsch regulates synaptic microtubule organization and is necessary for synaptic growth. *Neuron* 26, 371–382 . DOI :10.1016/s0896-6273(00)81170-8
- Roostalu, J., and Surrey, T. (2017). Microtubule nucleation: beyond the template. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 702–710 . DOI :10.1038/nrm.2017.75
- Roostalu, J., Thomas, C., Cade, N.I., Kunzelmann, S., Taylor, I.A., and Surrey, T. (2020). The speed of GTP hydrolysis determines GTP cap size and controls microtubule stability. *Elife* 9, 1–22 . DOI :10.7554/eLife.51992
- Rosa, J.-P., Raslova, H., and Bryckaert, M. (2019). Filamin A: key actor in platelet biology. *Blood* 134, 1279–1288 . DOI :10.1182/blood.2019000014
- Sabatini, D.D., Bensch, K., and Barrnett, R.J. (1963). Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.* 17, 19–58 . DOI :10.1083/jcb.17.1.19
- Do Sacramento, V., Mallo, L., Freund, M., Eckly, A., Hechler, B., Mangin, P., Lanza, F., Gachet, C., and Strassel, C. (2020). Functional properties of human platelets derived in vitro from CD34+ cells. *Sci. Rep.* 10, 914 . DOI :10.1038/s41598-020-57754-9
- Sadoul, K., and Khochbin, S. (2016). The growing landscape of tubulin acetylation: lysine 40 and many more. *Biochem. J.* 473, 1859–1868 . DOI :10.1042/BCJ20160172
- Sadoul, K., Wang, J., Diagouraga, B., Vitte, A.-L., Buchou, T., Rossini, T., Polack, B., Xi, X., Matthias, P., and Khochbin, S. (2012). HDAC6 controls the kinetics of platelet activation. *Blood* 120, 4215–4218 . DOI :10.1182/blood-2012-05-428011
- Sadoul, K., Joubert, C., Michallet, S., Nolte, E., Peronne, L., Ramirez-Rios, S., Ribba, A., and Lafanechère, L. (2018). [On the road to deciphering the tubulin code: focus on acetylation and deetyrosination]. *Med. Sci. (Paris)*. 34, 1047–1055 . DOI :10.1051/medsci/2018295
- Salinas, S., Carazo-Salas, R.E., Proukakis, C., Schiavo, G., and Warner, T.T. (2007). Spastin and microtubules: Functions in health and disease. *J. Neurosci. Res.* 85, 2778–2782 . DOI :10.1002/jnr.21238
- Sanghvi-Shah, R., and Weber, G.F. (2017). Intermediate Filaments at the Junction of Mechanotransduction, Migration, and Development. *Front. Cell Dev. Biol.* 5, 81 . DOI :10.3389/fcell.2017.00081

- Sanjuan-Pla, A., Macaulay, I.C., Jensen, C.T., Woll, P.S., Luis, T.C., Mead, A., Moore, S., Carella, C., Matsuoka, S., Bouriez Jones, T., et al. (2013). Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature* 502, 232–236 . DOI :10.1038/nature12495
- Sanyal, C., Pietsch, N., Ramirez Rios, S., Peris, L., Carrier, L., and Moutin, M.-J. (2021). The detyrosination/re-tyrosination cycle of tubulin and its role and dysfunction in neurons and cardiomyocytes. *Semin. Cell Dev. Biol.* . DOI :10.1016/j.semcdb.2021.12.006
- de Sauvage, F.J., Carver-Moore, K., Luoh, S.M., Ryan, A., Dowd, M., Eaton, D.L., and Moore, M.W. (1996). Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. *J. Exp. Med.* 183, 651–656 . DOI :10.1084/jem.183.2.651
- Schmoranzler, J., and Simon, S.M. (2003). Role of microtubules in fusion of post-Golgi vesicles to the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell* 14, 1558–1569 . DOI :10.1091/mbc.e02-08-0500
- Schuldt, M., Pei, J., Harakalova, M., Dorsch, L.M., Schlossarek, S., Mokry, M., Knol, J.C., Pham, T. V, Schelfhorst, T., Piersma, S.R., et al. (2021). Proteomic and Functional Studies Reveal Detyrosinated Tubulin as Treatment Target in Sarcomere Mutation-Induced Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ. Heart Fail.* 14, e007022 . DOI :10.1161/CIRCHEARTFAILURE.120.007022
- Schultze, M. (1865). Ein heizbarer Objecttisch und seine Verwendung bei Untersuchungen des Blutes. *Arch. Für Mikroskopische Anat.* 1, 1–42 . DOI :10.1007/BF02961404
- Schwer, H.D., Lecine, P., Tiwari, S., Italiano, J.E., Hartwig, J.H., and Shivdasani, R.A. (2001). A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr. Biol.* 11, 579–586 . DOI :10.1016/s0960-9822(01)00153-1
- Seetapun, D., Castle, B.T., McIntyre, A.J., Tran, P.T., and Odde, D.J. (2012). Estimating the microtubule GTP cap size in vivo. *Curr. Biol.* 22, 1681–1687 . DOI :10.1016/j.cub.2012.06.068
- Seita, J., and Weissman, I.L. (2010). Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2, 640–653 . DOI :10.1002/wsbm.86
- Selvadurai, M. V., and Hamilton, J.R. (2018). Structure and function of the open canalicular system - the platelet's specialized internal membrane network. *Platelets* 29, 319–325 . DOI :10.1080/09537104.2018.1431388
- Semeniak, D., Kulawig, R., Stegner, D., Meyer, I., Schwiebert, S., Bösing, H., Eckes, B., Nieswandt, B., and Schulze, H. (2016). Proplatelet formation is selectively inhibited by collagen type I through Syk-independent GPVI signaling. *J. Cell Sci.* 129, 3473–3484 . DOI :10.1242/jcs.187971
- Semeniak, D., Faber, K., Öftering, P., Manukjan, G., and Schulze, H. (2019). Impact of Itga2-Gp6-double collagen receptor deficient mice for bone marrow megakaryocytes and platelets. *PLoS One* 14, e0216839 . DOI :10.1371/journal.pone.0216839

- Serna, M., Carranza, G., Martín-Benito, J., Janowski, R., Canals, A., Coll, M., Zabala, J.C., and Valpuesta, J.M. (2015). The structure of the complex between α -tubulin, TBCE and TBCB reveals a tubulin dimer dissociation mechanism. *J. Cell Sci.* *128*, 1824–1834 . DOI :10.1242/jcs.167387
- Severin, S., Gaits-Iacovoni, F., Allart, S., Gratacap, M.-P., and Payrastre, B. (2013). A confocal-based morphometric analysis shows a functional crosstalk between the actin filament system and microtubules in thrombin-stimulated platelets. *J. Thromb. Haemost.* *11*, 183–186 . DOI :10.1111/jth.12053
- Sharda, A., and Flaumenhaft, R. (2018). The life cycle of platelet granules. *F1000Research* *7*, 236 . DOI :10.12688/f1000research.13283.1
- Shashi, V., Magiera, M.M., Klein, D., Zaki, M., Schoch, K., Rudnik-Schöneborn, S., Norman, A., Lopes Abath Neto, O., Dusl, M., Yuan, X., et al. (2018). Loss of tubulin deglutamylase CCP1 causes infantile-onset neurodegeneration. *EMBO J.* *37*, 1–12 . DOI :10.15252/embj.2018100540
- Shattil, S.J., Kim, C., and Ginsberg, M.H. (2010). The final steps of integrin activation: the end game. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 288–300 . DOI :10.1038/nrm2871
- Shelanski, M.L., and Taylor, E.W. (1967). Isolation of a protein subunit from microtubules. *J. Cell Biol.* *34*, 549–554 . DOI :10.1083/jcb.34.2.549
- Shida, T., Cueva, J.G., Xu, Z., Goodman, M.B., and Nachury, M. V. (2010). The major alpha-tubulin K40 acetyltransferase alphaTAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 21517–21522 . DOI :10.1073/pnas.1013728107
- Shivdasani, R.A., and Orkin, S.H. (1995). Erythropoiesis and globin gene expression in mice lacking the transcription factor NF-E2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 8690–8694 . DOI :10.1073/pnas.92.19.8690
- Shivdasani, R.A., Rosenblatt, M.F., Zucker-Franklin, D., Jackson, C.W., Hunt, P., Saris, C.J.M., and Orkin, S.H. (1995). Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell* *81*, 695–704 . DOI :10.1016/0092-8674(95)90531-6
- Shivdasani, R.A., Fujiwara, Y., McDevitt, M.A., and Orkin, S.H. (1997). A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J.* *16*, 3965–3973 . DOI :10.1093/emboj/16.13.3965
- Sirajuddin, M., Rice, L.M., and Vale, R.D. (2014). Regulation of microtubule motors by tubulin isoforms and post-translational modifications. *Nat. Cell Biol.* *16*, 335–344 . DOI :10.1038/ncb2920
- Skoda, R.C., Duek, A., and Grisouard, J. (2015). Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Exp. Hematol.* *43*, 599–608 . DOI :10.1016/j.exphem.2015.06.007

- Skultetyova, L., Ustinova, K., Kutil, Z., Novakova, Z., Pavlicek, J., Mikesova, J., Trapl, D., Baranova, P., Havlinova, B., Hubalek, M., et al. (2017). Human histone deacetylase 6 shows strong preference for tubulin dimers over assembled microtubules. *Sci. Rep.* 7, 11547 . DOI :10.1038/s41598-017-11739-3
- Slautterback, D.B. (1963). Cytoplasmic microtubules. i. hydra. *J. Cell Biol.* 18, 367–388 . DOI :10.1083/jcb.18.2.367
- Sleiman, P.M.A., March, M., Nguyen, K., Tian, L., Pellegrino, R., Hou, C., Dridi, W., Sager, M., Housawi, Y.H., and Hakonarson, H. (2017). Loss-of-Function Mutations in KIF15 Underlying a Braddock-Carey Genocopy. *Hum. Mutat.* 38, 507–510 . DOI :10.1002/humu.23188
- Sloboda, R.D., Rudolph, S.A., Rosenbaum, J.L., and Greengard, P. (1975). Cyclic AMP-dependent endogenous phosphorylation of a microtubule-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 177–181 . DOI :10.1073/pnas.72.1.177
- Sluder, G. (2005). Two-way traffic: centrosomes and the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 743–748 . DOI :10.1038/nrm1712
- Smyth, E.M. (2010). Thromboxane and the thromboxane receptor in cardiovascular disease. *Clin. Lipidol.* 5, 209–219 . DOI :10.2217/clp.10.11
- Smyth, S.S., Reis, E.D., Väänänen, H., Zhang, W., and Collier, B.S. (2001). Variable protection of beta 3-integrin-deficient mice from thrombosis initiated by different mechanisms. *Blood* 98, 1055–1062 . DOI :10.1182/blood.v98.4.1055
- Snell Taylor, S.J., Nielson, C.M., Breskin, A., Saul, B., Yu, Y., Alam, N., Eisen, M., Hippenmeyer, J., Janssens, A., Kozak, T., et al. (2021). Effectiveness and Safety of Romiplostim Among Patients with Newly Diagnosed, Persistent and Chronic Immune Thrombocytopenia in European Clinical Practice. *Adv. Ther.* 38, 2673–2688 . DOI :10.1007/s12325-021-01727-5
- Solar, G.P., Kerr, W.G., Zeigler, F.C., Hess, D., Donahue, C., de Sauvage, F.J., and Eaton, D.L. (1998). Role of c-mpl in early hematopoiesis. *Blood* 92, 4–10 . DOI :10.1182/blood.V92.1.4.413k38_4_10
- Song, Y., Kirkpatrick, L.L., Schilling, A.B., Helseth, D.L., Chabot, N., Keillor, J.W., Johnson, G.V.W., and Brady, S.T. (2013). Transglutaminase and polyamination of tubulin: posttranslational modification for stabilizing axonal microtubules. *Neuron* 78, 109–123 . DOI :10.1016/j.neuron.2013.01.036
- Songdej, N., and Rao, A.K. (2017). Inherited platelet dysfunction and hematopoietic transcription factor mutations. *Platelets* 28, 20–26 . DOI :10.1080/09537104.2016.1203400
- Spangrude, G.J. (1991). Hematopoietic stem-cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* 3, 171–178 . DOI :10.1016/0952-7915(91)90046-4
- Spritz, R.A., Chiang, P.W., Oiso, N., and Alkhateeb, A. (2003). Human and mouse disorders of pigmentation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 284–289 . DOI :10.1016/s0959-437x(03)00059-5

- Squire, J. (2019). Special Issue: The Actin-Myosin Interaction in Muscle: Background and Overview. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 5715 . DOI :10.3390/ijms20225715
- Stalker, T.J., Newman, D.K., Ma, P., Wannemacher, K.M., and Brass, L.F. (2012). Platelet signaling. *Handb. Exp. Pharmacol.* 59–85 . DOI :10.1007/978-3-642-29423-5_3
- Stefanini, L., and Bergmeier, W. (2016). RAP1-GTPase signaling and platelet function. *J. Mol. Med. (Berl)*. 94, 13–19 . DOI :10.1007/s00109-015-1346-3
- Stegner, D., VanEeuwijk, J.M.M., Angay, O., Gorelashvili, M.G., Semeniak, D., Pinnecker, J., Schmithausen, P., Meyer, I., Friedrich, M., Dütting, S., et al. (2017). Thrombopoiesis is spatially regulated by the bone marrow vasculature. *Nat. Commun.* 8, 127 . DOI :10.1038/s41467-017-00201-7
- Steiner, M., and Ikeda, Y. (1979). Quantitative assessment of polymerized and depolymerized platelet microtubules. Changes caused by aggregating agents. *J. Clin. Invest.* 63, 443–448 . DOI :10.1172/JCI109321
- Stenberg, P.E., McDonald, T.P., and Jackson, C.W. (1995). Disruption of microtubules in vivo by vincristine induces large membrane complexes and other cytoplasmic abnormalities in megakaryocytes and platelets of normal rats like those in human and Wistar Furth rat hereditary macrothrombocytopenias. *J. Cell. Physiol.* 162, 86–102 . DOI :10.1002/jcp.1041620111
- Stoupa, A., Adam, F., Kariyawasam, D., Strassel, C., Gawade, S., Szinnai, G., Kauskot, A., Lasne, D., Janke, C., Natarajan, K., et al. (2018). TUBB1 mutations cause thyroid dysgenesis associated with abnormal platelet physiology. *EMBO Mol. Med.* 10, 1–18 . DOI :10.15252/emmm.201809569
- Strassel, C., Nonne, C., Eckly, A., David, T., Leon, C., Freund, M., Cazenave, J.-P., Gachet, C., and Lanza, F. (2007). 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
- Strassel, C., Eckly, A., Léon, C., Petitjean, C., Freund, M., Cazenave, J.-P., Gachet, C., and Lanza, F. (2009). Intrinsic impaired proplatelet formation and microtubule coil assembly of megakaryocytes in a mouse model of Bernard-Soulier syndrome. *Haematologica* 94, 800–810 . DOI :10.3324/haematol.2008.001032
- Strassel, C., Magiera, M.M., Dupuis, A., Batzenschlager, M., Hovasse, A., Pleines, I., Guéguen, P., Eckly, A., Moog, S., Mallo, L., et al. (2019). An essential role for α 4A-tubulin in platelet biogenesis. *Life Sci. Alliance* 2, e201900309 . DOI :10.26508/lsa.201900309
- Sudo, H., and Baas, P.W. (2010). Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by katanin in neurons and fibroblasts. *J. Neurosci.* 30, 7215–7226 . DOI :10.1523/JNEUROSCI.0048-10.2010
- Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P.J., and Nagata, S. (2010). Calcium-dependent phospholipid

scrambling by TMEM16F. *Nature* 468, 834–838 . DOI :10.1038/nature09583

Svoboda, O., and Bartunek, P. (2015). Origins of the Vertebrate Erythro/Megakaryocytic System. *Biomed Res. Int.* 2015, 632171 . DOI :10.1155/2015/632171

Tablin, F., and Taube, D. (1987). Platelet intermediate filaments: detection of a vimentinlike protein in human and bovine platelets. *Cell Motil. Cytoskeleton* 8, 61–67 . DOI :10.1002/cm.970080109

Tablin, F., Castro, M., and Leven, R.M. (1990). Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *J. Cell Sci.* 97 (Pt 1), 59–70 . DOI :10.1242/jcs.97.1.59

Tang, C., Wang, Y., Lei, D., Huang, L., Wang, G., Chi, Q., Zheng, Y., Gachet, C., Mangin, P.H., and Zhu, L. (2016). Standardization of a well-controlled in vivo mouse model of thrombus formation induced by mechanical injury. *Thromb. Res.* 141, 49–57 . DOI :10.1016/j.thromres.2016.02.032

Terraube, V., O'Donnell, J.S., and Jenkins, P. V. (2010). Factor VIII and von Willebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance. *Haemophilia* 16, 3–13 . DOI :10.1111/j.1365-2516.2009.02005.x

Thawani, A., and Petry, S. (2021). Molecular insight into how γ -TuRC makes microtubules. *J. Cell Sci.* 134 . DOI :10.1242/jcs.245464

Thawani, A., Kadzik, R.S., and Petry, S. (2018). XMAP215 is a microtubule nucleation factor that functions synergistically with the γ -tubulin ring complex. *Nat. Cell Biol.* 20, 575–585 . DOI :10.1038/s41556-018-0091-6

Thomas, S.G. (2019). The structure of resting and activated platelets (Elsevier Inc.) . DOI :10.1016/B978-0-12-813456-6.00003-5

Thomas, D.W., Mannon, R.B., Mannon, P.J., Latour, A., Oliver, J.A., Hoffman, M., Smithies, O., Koller, B.H., and Coffman, T.M. (1998). Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A₂. *J. Clin. Invest.* 102, 1994–2001 . DOI :10.1172/JCI5116

Thon, J.N., Macleod, H., Begonja, A.J., Zhu, J., Lee, K.-C., Mogilner, A., Hartwig, J.H., and Italiano, J.E. (2012). Microtubule and cortical forces determine platelet size during vascular platelet production. *Nat. Commun.* 3, 852 . DOI :10.1038/ncomms1838

Thon, J.N., Mazutis, L., Wu, S., Sylman, J.L., Ehrlicher, A., Machlus, K.R., Feng, Q., Lu, S., Lanza, R., Neeves, K.B., et al. (2014). Platelet bioreactor-on-a-chip. *Blood* 124, 1857–1867 . DOI :10.1182/blood-2014-05-574913

Ti, S.-C., Wiczorek, M., and Kapoor, T.M. (2020). Purification of Affinity Tag-free Recombinant Tubulin from Insect Cells. *STAR Protoc.* 1, 100011 . DOI :10.1016/j.xpro.2019.100011

Tian, G., and Cowan, N.J. (2013). Tubulin-Specific Chaperones. pp. 155–171 . DOI :10.1016/B978-0-

12-407757-7.00011-6

- Tian, G., Vainberg, I.E., Tap, W.D., Lewis, S.A., and Cowan, N.J. (1995). Quasi-native chaperonin-bound intermediates in facilitated protein folding. *J. Biol. Chem.* 270, 23910–23913 . DOI :10.1074/jbc.270.41.23910
- Till, J.E., and McCulloch, E.A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* 14, 213–222 . DOI :10.2307/3570892
- Tort, O., Tanco, S., Rocha, C., Bièche, I., Seixas, C., Bosc, C., Andrieux, A., Moutin, M.-J., Avilés, F.X., Lorenzo, J., et al. (2014). The cytosolic carboxypeptidases CCP2 and CCP3 catalyze posttranslational removal of acidic amino acids. *Mol. Biol. Cell* 25, 3017–3027 . DOI :10.1091/mbc.E14-06-1072
- Tozzi, L., Laurent, P.-A., Di Buduo, C.A., Mu, X., Massaro, A., Bretherton, R., Stoppel, W., Kaplan, D.L., and Balduini, A. (2018). Multi-channel silk sponge mimicking bone marrow vascular niche for platelet production. *Biomaterials* 178, 122–133 . DOI :10.1016/j.biomaterials.2018.06.018
- Tronik-Le Roux, D., Roullot, V., Poujol, C., Kortulewski, T., Nurden, P., and Marguerie, G. (2000). Thrombasthenic mice generated by replacement of the integrin alpha(IIb) gene: demonstration that transcriptional activation of this megakaryocytic locus precedes lineage commitment. *Blood* 96, 1399–1408 . DOI :10.1182/blood.v96.4.1399
- Trumpp, A., Essers, M., and Wilson, A. (2010). Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 201–209 . DOI :10.1038/nri2726
- Vahidkhah, K., and Bagchi, P. (2015). Microparticle shape effects on margination, near-wall dynamics and adhesion in a three-dimensional simulation of red blood cell suspension. *Soft Matter* 11, 2097–2109 . DOI :10.1039/c4sm02686a
- Vainchenker, W., Besancenot, R., and Favale, F. (2013). [Megakaryopoiesis: regulation of platelet production by thrombopoietin]. *Bull. Acad. Natl. Med.* 197, 395–406 . DOI :10.1016/s0001-4079(19)31594-8
- Valenstein, M.L., and Roll-Mecak, A. (2016). Graded Control of Microtubule Severing by Tubulin Glutamylation. *Cell* 164, 911–921 . DOI :10.1016/j.cell.2016.01.019
- Valet, C., Batut, A., Vauclard, A., Dortignac, A., Bellio, M., Payrastra, B., Valet, P., and Severin, S. (2020). Adipocyte Fatty Acid Transfer Supports Megakaryocyte Maturation. *Cell Rep.* 32, 107875 . DOI :10.1016/j.celrep.2020.107875
- Vallee, R.B., and Borisy, G.G. (1977). Removal of the projections from cytoplasmic microtubules in vitro by digestion with trypsin. *J. Biol. Chem.* 252, 377–382 . DOI :10.1016/s0021-9258(17)32839-9
- Varga-Szabo, D., Braun, A., and Nieswandt, B. (2009). Calcium signaling in platelets. *J. Thromb. Haemost.* 7, 1057–1066 . DOI :10.1111/j.1538-7836.2009.03455.x

- Vemu, A., Atherton, J., Spector, J.O., Moores, C.A., and Roll-Mecak, A. (2017). Tubulin isoform composition tunes microtubule dynamics. *Mol. Biol. Cell* 28, 3564–3572 . DOI :10.1091/mbc.E17-02-0124
- Verhey, K.J., and Gaertig, J. (2007). The tubulin code. *Cell Cycle* 6, 2152–2160 . DOI :10.4161/cc.6.17.4633
- Versteeg, H.H., Heemskerk, J.W.M., Levi, M., and Reitsma, P.H. (2013). New fundamentals in hemostasis. *Physiol. Rev.* 93, 327–358 . DOI :10.1152/physrev.00016.2011
- Vigon, I., Mornon, J.P., Cocault, L., Mitjavila, M.T., Tambourin, P., Gisselbrecht, S., and Souyri, M. (1992). Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 5640–5644 . DOI :10.1073/pnas.89.12.5640
- van de Vijver, E., De Cuyper, I.M., Gerrits, A.J., Verhoeven, A.J., Seeger, K., Gutiérrez, L., van den Berg, T.K., and Kuijpers, T.W. (2012). Defects in Glanzmann thrombasthenia and LAD-III (LAD-1/v) syndrome: the role of integrin $\beta 1$ and $\beta 3$ in platelet adhesion to collagen. *Blood* 119, 583–586 . DOI :10.1182/blood-2011-02-337188
- Vyas, P., Ault, K., Jackson, C.W., Orkin, S.H., and Shivdasani, R.A. (1999). Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood* 93, 2867–2875 . DOI :10.1182/blood.v93.9.2867.409k24_2867_2875
- Wagner, C.L., Mascelli, M.A., Neblock, D.S., Weisman, H.F., Collier, B.S., and Jordan, R.E. (1996). Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 88, 907–914 . DOI :10.1182/blood.V88.3.907.907
- Wang, D., Villasante, A., Lewis, S.A., and Cowan, N.J. (1986). The mammalian beta-tubulin repertoire: hematopoietic expression of a novel, heterologous beta-tubulin isotype. *J. Cell Biol.* 103, 1903–1910 . DOI :10.1083/jcb.103.5.1903
- Wang, Q., Stacy, T., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A.H., and Speck, N.A. (1996). Disruption of the *Cbfa2* gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 3444–3449 . DOI :10.1073/pnas.93.8.3444
- Wang, Y., Chen, W., Zhang, W., Lee-Sundlov, M.M., Casari, C., Berndt, M.C., Lanza, F., Bergmeier, W., Hoffmeister, K.M., Zhang, X.F., et al. (2021). Desialylation of O-glycans on glycoprotein Iba drives receptor signaling and platelet clearance. *Haematologica* 106, 220–229 . DOI :10.3324/haematol.2019.240440
- Van de Water, L., and Olmsted, J.B. (1980). The quantitation of tubulin in neuroblastoma cells by radioimmunoassay. *J. Biol. Chem.* 255, 10744–10751 . DOI :10.1016/S0021-9258(19)70370-6
- Weinstein, B., and Solomon, F. (1990). Phenotypic consequences of tubulin overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*: differences between alpha-tubulin and beta-tubulin. *Mol. Cell. Biol.* 10, 5295–5304 . DOI :10.1128/mcb.10.10.5295-5304.1990

- White, J.G. (1968). Effects of colchicine and Vinca alkaloids on human platelets. I. Influence on platelet microtubules and contractile function. *Am. J. Pathol.* *53*, 281–291
- White, J.G. (1969). Effects of colchicine and vinca alkaloids on human platelets. 3. Influence on primary internal contraction and secondary aggregation. *Am. J. Pathol.* *54*, 467–478
- White, J.G., and Rao, G.H. (1982). Effects of a microtubule stabilizing agent on the response of platelets to vincristine. *Blood* *60*, 474–483 . DOI :10.1182/blood.V60.2.474.474
- White, J.G., and Rao, G.H.R. (1998). Microtubule coils versus the surface membrane cytoskeleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape. *Am. J. Pathol.* *152*, 597–609
- Wise, D.O.N., Krahe, R., and Oakley, B.R. (2000). The gamma-tubulin gene family in humans. *Genomics* *67*, 164–170 . DOI :10.1006/geno.2000.6247
- Wloga, D., Webster, D.M., Rogowski, K., Bré, M.-H., Levilliers, N., Jerka-Dziadosz, M., Janke, C., Dougan, S.T., and Gaertig, J. (2009). TLL3 Is a tubulin glycine ligase that regulates the assembly of cilia. *Dev. Cell* *16*, 867–876 . DOI :10.1016/j.devcel.2009.04.008
- Wolff, A., Denoulet, P., and Jeantet, C. (1982). High level of tubulin microheterogeneity in the mouse brain. *Neurosci. Lett.* *31*, 323–328 . DOI :10.1016/0304-3940(82)90041-6
- Wolff, A., de Néchaud, B., Chillet, D., Mazarguil, H., Desbruyères, E., Audebert, S., Eddé, B., Gros, F., and Denoulet, P. (1992). Distribution of glutamylated alpha and beta-tubulin in mouse tissues using a specific monoclonal antibody, GT335. *Eur. J. Cell Biol.* *59*, 425–432
- Wright, J.H. (1906). The Origin and Nature of the Blood Plates. *Bost. Med. Surg. J.* *154*, 643–645 . DOI :10.1056/NEJM190606071542301
- Xu, Z., Schaedel, L., Portran, D., Aguilar, A., Gaillard, J., Marinkovich, M.P., Théry, M., and Nachury, M. V. (2017). Microtubules acquire resistance from mechanical breakage through intraluminal acetylation. *Science* *356*, 328–332 . DOI :10.1126/science.aai8764
- Yamada, E. (1957). The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Cells Tissues Organs* *29*, 267–290 . DOI :10.1159/000141169
- Yamamoto, R., Morita, Y., Ooehara, J., Hamanaka, S., Onodera, M., Rudolph, K.L., Ema, H., and Nakauchi, H. (2013). Clonal Analysis Unveils Self-Renewing Lineage-Restricted Progenitors Generated Directly from Hematopoietic Stem Cells. *Cell* *154*, 1112–1126 . DOI :10.1016/j.cell.2013.08.007
- Yang, H., Ganguly, A., Yin, S., and Cabral, F. (2011). Megakaryocyte lineage-specific class VI β -tubulin suppresses microtubule dynamics, fragments microtubules, and blocks cell division. *Cytoskeleton (Hoboken)*. *68*, 175–187 . DOI :10.1002/cm.20503
- Yang, W.-T., Hong, S.-R., He, K., Ling, K., Shaiv, K., Hu, J., and Lin, Y.-C. (2021). The Emerging Roles of Axonemal Glutamylation in Regulation of Cilia Architecture and Functions. *Front. Cell Dev. Biol.* *9*, 622302 . DOI :10.3389/fcell.2021.622302

- Ye, B., Li, C., Yang, Z., Wang, Y., Hao, J., Wang, L., Li, Y., Du, Y., Hao, L., Liu, B., et al. (2014). Cytosolic carboxypeptidase CCP6 is required for megakaryopoiesis by modulating Mad2 polyglutamylation. *J. Exp. Med.* *211*, 2439–2454 . DOI :10.1084/jem.20141123
- Ye, F., Kim, C., and Ginsberg, M.H. (2011). Molecular mechanism of inside-out integrin regulation. *J. Thromb. Haemost.* *9 Suppl 1*, 20–25 . DOI :10.1111/j.1538-7836.2011.04355.x
- Yeaman, M.R. (2014). Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nat. Rev. Microbiol.* *12*, 426–437 . DOI :10.1038/nrmicro3269
- Yuba-Kubo, A., Kubo, A., Hata, M., and Tsukita, S. (2005). Gene knockout analysis of two gamma-tubulin isoforms in mice. *Dev. Biol.* *282*, 361–373 . DOI :10.1016/j.ydbio.2005.03.031
- Zahedi, R.P., Lewandrowski, U., Wiesner, J., Wortelkamp, S., Moebius, J., Schütz, C., Walter, U., Gambaryan, S., and Sickmann, A. (2008). Phosphoproteome of resting human platelets. *J. Proteome Res.* *7*, 526–534 . DOI :10.1021/pro704130
- Zhang, Y., Kwon, S., Yamaguchi, T., Cubizolles, F., Rousseaux, S., Kneissel, M., Cao, C., Li, N., Cheng, H.-L., Chua, K., et al. (2008). Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 1688–1701 . DOI :10.1128/MCB.01154-06
- Zharikov, S., and Shiva, S. (2013). Platelet mitochondrial function: from regulation of thrombosis to biomarker of disease. *Biochem. Soc. Trans.* *41*, 118–123 . DOI :10.1042/BST20120327
- Zimmet, J.M., Ladd, D., Jackson, C.W., Stenberg, P.E., and Ravid, K. (1997). A role for cyclin D3 in the endomitotic cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 7248–7259 . DOI :10.1128/MCB.17.12.7248

Caractérisation biochimique et fonctionnelle du code tubuline des plaquettes sanguines

Les plaquettes sanguines sont de petits fragments cellulaires anucléés qui assurent l'hémostase. Elles sont produites par les mégacaryocytes de la moelle osseuse à l'issue d'un processus complexe qui comprend de profonds remaniements du cytosquelette de microtubule. L'un des derniers événements consiste en la formation d'une structure circulaire et sous-membranaire unique aux mammifères, appelée bande marginale, dont le rôle est d'assurer la forme discoïde typique des plaquettes circulantes. D'un point de vue mécanistique, l'ensemble des remaniements microtubulaires seraient contrôlés par un code tubuline propre au lignage plaquettaire. Dans ce travail, nous montrons que i) les isotypes de tubuline $\alpha 4A$ et $\beta 1$ coopèrent ensemble pour assurer l'assemblage de la bande marginale, et que leur double inactivation chez la souris entraîne la formation de plaquettes sphériques dépourvues de bande marginale et incapables d'assurer l'hémostase ; ii) des mutations dans l'isotype $\alpha 8$ perturbent la biogenèse des plaquettes et leur bande marginale, causant des macrothrombopénies chez l'Homme et ; iii) plusieurs modifications post-traductionnelles de tubuline sont retrouvées dans la lignée plaquettaire, dont les rôles restent encore à élucider. Ensemble, nos résultats pourraient avoir des applications directes dans les pathologies plaquettaires et la transfusion.

Blood platelets are small non-nucleated cellular fragments that ensure hemostasis. They are produced by bone marrow megakaryocytes following extensive microtubule rearrangements that culminate in the formation of a unique circular sub-membranous microtubule array, called marginal band, which supports the typical disc-shaped morphology of circulating platelets. Mechanistically, these microtubular rearrangements are thought to be controlled by a platelet-specific tubulin code. Here, we show that i) the $\alpha 4A$ - and $\beta 1$ -tubulin isotypes both cooperate to assemble the marginal band, and that their combined deficiency in mice results in fully spherical platelets devoid of marginal band that are unable to perform hemostasis; ii) mutations in the $\alpha 8$ -tubulin isotype can alter platelet and marginal band formation and cause macrothrombocytopenia in humans and; iii) several tubulin post-translational modifications are found in the platelet lineage, with functions that remain to be evaluated. Together, these results shed new light on a very specialized microtubule assembly process with applications in platelet diseases and transfusion.