



HAL
open science

Formation des plaquettes sanguines : étude des mécanismes d'intravasation des mégacaryocytes au travers des sinusoides médullaires

Cyril Scandola

► **To cite this version:**

Cyril Scandola. Formation des plaquettes sanguines : étude des mécanismes d'intravasation des mégacaryocytes au travers des sinusoides médullaires. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg, 2021. Français. NNT : 2021STRAJ037 . tel-04416281

HAL Id: tel-04416281

<https://theses.hal.science/tel-04416281v1>

Submitted on 25 Jan 2024

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 SANTE

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

THÈSE

Présentée par

Cyril SCANDOLA

Soutenue le **24 septembre 2021**

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

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

Formation des plaquettes sanguines : étude des mécanismes d'intravasation des mégacaryocytes au travers des sinusoides médullaires

THÈSE dirigée par :

Mme Anita ECKLY-MICHEL

CR, EFS, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme Najet DEBILI

DRE, CNRS, Université de Paris

M Olivier DESTAING

CR, CNRS, Université de Grenoble

EXAMINATEUR :

M Philippe RONDÉ

DR, CNRS, Université de Strasbourg

INSERM UMR_S1255

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

Directeur : Professeur Christian GACHET

Etablissement Français du Sang (EFS) – Grand Est

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

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

Directeur de thèse :

Docteur Anita ECKLY-MICHEL

E-mail : anita.michel@efs.sante.fr

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier le directeur de l'unité, Dr Christian Gachet, de m'avoir permis d'intégrer son laboratoire de recherche au cours de mon stage de Master 2 avant de poursuivre avec cette thèse.

Je tiens à remercier Najet Debili, Olivier Destaing, Philippe Rondé d'avoir accepté de siéger dans mon jury et d'évaluer mes travaux de thèse. Merci également à Jean-Claude Bordet d'avoir accepté mon invitation à participer à ma soutenance de thèse.

Je souhaite ensuite remercier tout particulièrement ma directrice de thèse, Anita Eckly-Michel, d'avoir cru en moi, de m'avoir accompagné et formé tout au long de cette aventure. Merci de m'avoir transmis ta passion pour l'imagerie et la microscopie électronique. Je garderai précieusement le souvenir de nos journées d'observation.

Je remercie également tous mes collègues de l'équipe de microscopie électronique, Fabienne, Jean-Yves et David, qui ont su rapidement m'intégrer, me faire profiter de leur expertise et pour leur aide précieuse au cours de mes projets. Merci Fabienne de m'avoir appris à utiliser tes outils d'horloger suisse de l'ultramicrotomie. Merci Jean-Yves de m'avoir ouvert les portes de l'ancre du FIB-SEM, de la modélisation 3D sur Amira et du biphoton. Merci David de m'avoir perfectionné en culture cellulaire et de m'avoir initié à la coupe au vibratome. On a partagé de bons moments tous ensemble tant à la paillasse qu'au coin café.

Je vous remercie tous. Vous qui m'avez transmis vos conseils, m'avez supporté (dans tous les sens du terme) depuis mon master 2, en passant par la préparation du concours de l'Ecole Doctorale, puis tout au long de ma thèse. Le chemin a été semé d'embûches mais tellement enrichissant. Je tâcherai à mon tour de transmettre ce que chacun a pu m'apprendre.

J'adresse mes remerciements à François Lanza, Pierre Mangin, Henri de la Salle, Blandine Maître, Catherine Strassel, Béatrice Hechler, Catherine Léon, Nathalie Brouard et Catherine Ravanat pour les conseils scientifiques ainsi que le regard critique qu'ils m'ont apporté au cours de ma thèse.

Je voudrais également adresser mes remerciements les plus sincères à François et Emily pour la relecture de ce présent manuscrit, vos précieuses remarques m'ont été profitables.

Je remercie Josiane, Sylvie, Léa, Monique, Stéphanie, Catherine B., Catherine Z., Catherine A., d'avoir su me prodiguer leur aide scientifique et technique et d'avoir pu me former à de nombreuses techniques de la RTqPCR à l'histologie sur paraffine.

Mes pensées vont également aux autres collègues qui m'ont accompagné et soutenu durant ces quelques mois et années passés ensemble : Anaïs, Desline, Marc, Cécile, Adeline, Valérie, Quentin, Sasha, Julie, Emily, Alicia, Inès, Adèle, Kévin, Usman, Florian, Axelle, Elisa, Pierre S., Ségolène, Laurie, Léna.

Je souhaite montrer ma gratitude à ceux qui m'ont permis de participer à leurs projets scientifiques et de prendre part à leurs publications, notamment Yotis, Pierre, Emily et Sasha.

Enfin, je remercie toutes les autres personnes que j'ai pu côtoyer de près ou de loin au cours de mon chemin à l'EFS. Que ce soit pour une question, une discussion informelle ou encore un échange de sourires au quotidien, vous avez toujours été là et je vous en suis reconnaissant.

Je ne peux malheureusement pas tous vous citer de façon exhaustive, c'est pourquoi je vous dis simplement que les personnes concernées se reconnaitront et que chacun d'entre vous participe à l'atmosphère bienveillante de la petite famille qu'est ce laboratoire. Mercis.

Tables des matières

Liste des abréviations.....	i
Table des figures.....	iv
Table des tableaux.....	vi
Liste des communications.....	vii
Collaborations.....	viii
Introduction générale.....	ix

Revue bibliographique

Chapitre 1 : La mégacaryopoïèse et la formation des plaquettes sanguines.....	1
1.1. Les plaquettes sanguines	2
1.1.1. Les plaquettes sanguines	2
1.1.2. L'hémostase primaire	3
1.1.3. La clairance des plaquettes	4
1.1.4. Les anomalies de la production plaquettaire.....	5
1.2 Le mégacaryocyte, le précurseur direct des plaquettes	6
1.2.1. Les mégacaryocytes se différencient dans la moelle osseuse	6
1.2.2. La maturation du mégacaryocyte.....	8
1.2.3. L'empéripolèse.....	10
1.2.4. Le franchissement de la barrière sinusoidale.....	11
1.3. L'étape finale : la production plaquettes	15
1.3.1. La thrombopoïèse : les études <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	15
1.3.2. Le bourgeonnement membranaire des mégacaryocytes.....	18
1.3.3. Le rôle du poumon dans la biogénèse des plaquettes	19
Chapitre 2 : Le microenvironnement de la moelle osseuse.....	21
2.1. La matrice extracellulaire	21
2.1.1. Les composants-clefs de la matrice extracellulaire (MEC).....	22
2.1.2. La matrice interstitielle.....	24
2.1.3. La lame basale.....	26
2.2 La composante cellulaire du microenvironnement.....	27
2.2.1. Les cellules endothéliales des sinusoides médullaires.....	27
2.2.2. Autres composants cellulaires associés aux sinusoides.	29
Chapitre 3 : Les intégrines.....	31
3.1. Des récepteurs cellulaires intermédiaires entre matrice et cellules.....	31
3.1.1. La famille des intégrines.....	31
3.1.2. Les différentes conformations des intégrines.....	33
3.1.3. La signalisation bidirectionnelle.....	33
3.1.4. Association des intégrines avec des molécules adaptatrices.....	34

3.2	Intégrines et fonctions cellulaires impliquées dans la transmigration.....	35
3.2.1.	L'adhérence cellulaire.....	35
3.2.2.	(Trans)Migration	37
3.2.3.	L'organisation et le remodelage de la matrice	39
3.2.4.	Les intégrines et leurs liens avec le noyau	39
3.3.	Les intégrines jouent-elles un rôle dans la formation des plaquettes sanguines ?.....	40
3.3.1.	Les données cliniques.....	40
3.3.2.	Les données expérimentales.....	41
 Chapitre 4 : Les podosomes.....		43
4.1.	Une structure d'adhérence particulière : le podosome.....	44
4.1.1.	Les principales caractéristiques des podosomes.....	44
4.1.2.	Focus sur le cytosquelette des invadosomes.....	46
4.1.3.	Régulation de la formation des podosomes.....	48
4.2	Tour d'horizon sur les fonctions des invadosomes.....	49
4.2.1.	Adhérence et dégradation de la matrice extracellulaire.....	49
4.2.2.	Remodelage de la matrice par la force du cytosquelette d'actine	51
4.2.3	L'invasion cellulaire.....	52
4.3.	Les mégacaryocytes forment des podosomes <i>in vitro</i>.....	54
4.3.1.	Les podosomes des mégacaryocytes.....	54
4.3.2.	Déficits touchant un élément de signalisation commun aux podosomes.....	56
 Objectifs de la thèse.....		58
 Axe 1 : Comprendre la nature des extensions émises par les MKs, en particulier leur organisation du cytosquelette		
		61
1.	Résumé de l'étude.....	62
2.	Publication dans JTH, 2020.....	64
3.	Résultats supplémentaires.....	89
 Axe 2 : Évaluer le rôle des intégrines dans le passage des MKs au travers l'endothélium.....		92
1.	Résumé de l'étude.....	93
2.	Manuscrit en cours de rédaction.....	96
3.	Discussion et perspectives.....	120
 Axe 3 : Déterminer si une activité de dégradation de la matrice extracellulaire est nécessaire au passage transendothélial des MKs.....		124
1.	Résumé de l'étude.....	125

2.	Résultats.....	127
3.	Discussion et perspectives.....	140
Conclusion générale		143
Perspectives		144
Annexes.....		147
Références bibliographiques		

Liste des Abréviations

2D	deux dimensions
3D	trois dimensions
A	
A _c LDL	<i>acetylated low density lipoprotein</i> (Lipoprotéine de basse densité acétylée)
ADP	adénosine diphosphate
AMR	<i>récepteur Ashwell-Morell</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (analyse de variance)
ATP	adénosine triphosphate
B	
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (albumine sérique bovine)
C	
CAR	<i>CXCL12-abondant reticular cells</i>
C-MPL	<i>cellular-myeloproliferative leukemia</i>
COVID-19	<i>coronavirus disease 2019</i>
CSH	cellule souche hématopoïétique
D	
DAPI	4,6-diamono-2-Phénylindole dihydrochloride
DKO	<i>double knock-out itgb1^{-/-}itgb3^{-/-}</i> (double KO intégrines $\beta 1\beta 3$)
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle medium</i>
DMS	<i>demarcation membrane system</i>
DONALD	<i>direct optical nanoscopy with axially localized detection</i>
E	
EDA	<i>extra domain A</i>
EDB	<i>extra domain B</i>
EDTA	acide éthylène diamine tetra acétique
EYFP	<i>extended yellow fluorescent protein</i>
F	
FABP4	<i>fatty acid binding protein 4</i>
F-Actine	actine filamenteuse
FAK	<i>focal adhesion kinase</i> (protéines kinase des contacts focaux)
FGF-4	<i>fibroblast growth factor</i> (facteur de croissance des fibroblastes)
FW	facteur de von Willebrand
G	
GA	glutaraldéhyde
GAGs	glycosaminoglycanes
Golgi	appareil de Golgi
GP	glycoprotéines

H DAC	histone désacétylase 6
HIT	<i>heparin-induced thrombocytopenia</i>
I EM	<i>immunogoldEM</i> (Immunomarquage aux billes d'or en microscopie électronique)
K O	<i>Knock Out</i>
L DL	<i>low density lipoprotein</i> (lipoprotéine de basse densité)
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LINC	<i>linker of nucleoskeleton and cytoskeleton</i>
M E	microscopie électronique
MEB	microscopie électronique à balayage
MEC	matrice extracellulaire
MEP	<i>megakaryocyte–erythroid progenitor cell</i> (progéniteur érythroïde/mégacaryocytaire)
MET	microscopie électronique à transmission
MK	mégacaryocyte
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i> (métalloprotéase matricielle)
MO	moelle osseuse
O CS	<i>Open canalicular system</i> (système canaliculaire ouvert)
P BS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PECAM	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
PF4	<i>platelet factor 4</i>
PFA	Paraformaldéhyde
PHEM	Pipes, Hepes, EGTA, Magnésium
PMA	<i>phorbol myristate acetate</i>
PodopZ	<i>podosomes of the peripheral zone</i>
PSG	pénicilline, streptomycine, glutamine
PZ	<i>peripheral zone</i> (zone périphérique)
R E	Réticulum Endoplasmique
RFP	<i>Red fluorescent protein</i>
S CF	<i>stem cell factor</i>

SDF-1	<i>stromal cell-derived factor</i> (facteur dérivé des cellules stromales)
SEM	<i>standard error of the mean</i> (erreur standard à la moyenne)
SVF	sérum de veau fœtal
S1P	sphingosine 1-phosphate
T GF- β 1	<i>transforming growth factor-beta1</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TPO	thrombopoïétine
V CAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
W AS	<i>Wiskott-Aldrich syndrome</i> (Syndrome de Wiskott-Aldrich)
WASp	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i> (protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich)
WT	<i>wild type</i>
Y FP	<i>yellow fluorescent protein</i>

Table des figures

- Figure 1 :** La plaquette sanguine sous toutes ses formes.
- Figure 2 :** Les plaquettes dans l'hémostase primaire.
- Figure 3 :** Le rôle de l'apoptose dans la biologie des mégacaryocytes et des plaquettes.
- Figure 4 :** Boucle de régulation de la thrombopoïétine, production et sénescence des plaquettes.
- Figure 5 :** L'engagement de la lignée mégacaryocytaire dans l'hématopoïèse.
- Figure 6 :** Les différents stades de maturation du mégacaryocyte
- Figure 7 :** De la mégacaryopoïèse à la libération des plaquettes sanguines.
- Figure 8 :** L'endomitose dans la maturation du mégacaryocyte.
- Figure 9 :** Les étapes précoces de développement du DMS.
- Figure 10 :** Comparaison *in situ* vs *in vitro* de la morphologie des MKs observés par MET et MEB.
- Figure 11 :** L'empéripolèse est la présence de neutrophiles dans les membranes internes du cytoplasme de certains mégacaryocytes.
- Figure 12 :** Le SDF-1 et le positionnement des MKs au niveau des sinusoides.
- Figure 13 :** L'expression des lamines nucléaires lors de la maturation des MKs.
- Figure 14 :** Historique de la biologie des mégacaryocytes et des plaquettes.
- Figure 15 :** Le bourgeonnement membranaire des mégacaryocytes et la formation des plaquettes.
- Figure 16 :** Rôle du poumon dans la biogenèse des plaquettes.
- Figure 17 :** Différents modèles sont proposés pour expliquer la formation des plaquettes à partir des mégacaryocytes.
- Figure 18 :** Les principales molécules de la matrice extracellulaire.
- Figure 19 :** La synthèse de matrice extracellulaire par les mégacaryocytes.
- Figure 20 :** La lame basale est un réseau de protéines de matrice extracellulaires.
- Figure 21 :** Caractéristiques distinctes des artérioles et des sinusoides
- Figure 22 :** La barrière endothéliale est active durant la diapédèse leucocytaire.
- Figure 23 :** L'inhibition de RhoA par des toxines bactériennes induit la formation de pores endothéliaux transitoires en déstabilisant le cytosquelette d'acto-myosine.
- Figure 24 :** Représentation schématique de la famille des intégrines.

- Figure 25 :** L'activation des intégrines.
- Figure 26 :** La signalisation « inside-out » et « outside-in » de l'intégrine $\alpha 11\beta 3$.
- Figure 27 :** Représentation schématique d'une structure d'adhérence.
- Figure 28 :** Formation des adhérences focales.
- Figure 29 :** Les étapes de l'adhérence cellulaire in vitro sur une matrice de fibronectine.
- Figure 30 :** Régulation des adhérences focales par les GTPases.
- Figure 31 :** Rôles distincts des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ dans les adhésions focales.
- Figure 32 :** Rôle des intégrines dans la migration de différents types cellulaires.
- Figure 33 :** Caractéristiques des modes de migration mésenchymateuse et migration amoéboïde.
- Figure 34 :** Le remodelage de la fibronectine se déroule en différentes étapes impliquant les intégrines.
- Figure 35 :** Démonstration de la connexion mécanique entre les intégrines, les filaments du cytosquelette et le noyau.
- Figure 36 :** Les intégrines forment un lien avec le cytosquelette nucléaire via le complexe LINC.
- Figure 37 :** La structure de base du podosome.
- Figure 38 :** Les différentes configurations des podosomes en 2D.
- Figure 39 :** Différences de distribution et caractéristiques des podosomes en 2D et en 3D.
- Figure 40 :** Les podosomes sont des structures interconnectées par le réseau d'actine.
- Figure 41 :** L'architecture de la coiffe dans l'organisation collective des podosomes.
- Figure 42 :** Modèle de la formation et la maturation des invadopodes.
- Figure 43 :** Modèle de formation des invadosomes.
- Figure 44 :** Effecteurs de la signalisation des invadosomes.
- Figure 45 :** L'activité de dégradation de matrice et d'invasion des invadosomes est MT1-MMP dépendante.
- Figure 46 :** Invasion des podosomes de macrophages au travers d'un gel 3D de collagène.
- Figure 47 :** Organisation des protéines et génération de la force du podosome.
- Figure 48 :** Le passage de la barrière endothéliale.
- Figure 49 :** Invasion d'une lame basale mésothéliale par des cellules tumorales.
- Figure 50 :** Les podosomes précurseurs et successeurs.

Figure 51 : Les mégacaryocytes forment des podosomes in vitro capables de dégradation.

Table des tableaux

Tableau 1 : Les protéines régulatrices du cytosquelette d'actine et la mégacaryopoïèse.

Tableau 2 : Les GTPases et la mégacaryopoïèse.

Tableau 3 : Les protéines associées aux intégrines et aux structures d'adhérence.

Liste des Communications

Publications

1. *Heparan sulfates are critical regulators of the inhibitory megakaryocyte-platelet receptor G6b-B*, Vögtle T., Sharma S., Mori J., Nagy Z., Semeniak D., **Scandola C.**, Geer M.J., Smith C.W., Lane J., Pollack S., Lassila R., Jouppila A., Barr A.J., Ogg D.J., Howard T.D., McMiken H.J., Warwicker J., Geh C., Rowlinson R., Abbott W.M., Eckly A., Schulze H., Wright GJ., Mazharian A., Fütterer K., Rajesh S., Douglas MR., Senis Y.A., eLIFE, 2019.
2. *Megakaryocytes use in vivo podosome-like structures working collectively to penetrate the endothelial barrier of bone marrow sinusoids*, Eckly A., **Scandola C.**, Oprescu A., Michel D., Rinckel J-Y., Proamer F., Hoffmann D., Receveur N., Léon C., Bear J.E., Ghalloussi D., Harousseau G., Bergmeier W., Lanza F., Gaits-Iacovoni F., de la Salle H., Gachet C., Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2020.
3. *Use of electron microscopy to study megakaryocytes*, **Scandola C.**, Erhardt M., Rinckel J-Y., Proamer F., Gachet C., Eckly A., Platelets, 2020.
4. *In Situ Exploration of Murine Megakaryopoiesis using Transmission Electron Microscopy*, **Scandola C.**, Lanza F., Gachet C., Eckly A., Journal of Visualized Experiments, 2021.
5. *Characterization of the role of integrin $\alpha 5\beta 1$ in platelet function, hemostasis and experimental thrombosis*, Janus-Bell E., Yakusheva A., **Scandola C.**, Receveur N., Ahmed U.M., Mouriaux C., Bourdon C., Eckly A., Senis Y.A., Panteleev M.A., Gachet C., Mangin P.H., soumis à Thrombosis and Haemostasis.
6. *$\beta 1$ and $\beta 3$ integrins prevent the passage of entire megakaryocytes across the sinusoids of the bone marrow*, **Scandola C.**, Rinckel J-Y., Proamer F., Hoffmann D., Bornert A., Léon C., Laquerrière P., Lanza F., de la Salle H., Gachet C., Eckly A., en cours de rédaction.

Communications orales

1. *Etude du passage des mégacaryocytes au travers des sinusoides médullaires*, **Scandola C.**, Oprescu A., Michel D., Rinckel J-Y., Proamer F., Hoffmann D., Lanza F., Gaits-Iacovoni F., de la Salle H., Gachet C., Eckly A., Cercle des microscopistes JEOL 2019, Nancy, 23-25 septembre 2019.
2. *$\beta 1$ and $\beta 3$ integrins limit the passage of entire megakaryocytes across the sinusoids of the bone marrow*, **Scandola C.**, Rinckel J-Y., Proamer F., Hoffmann D., Bornert A., Léon C., Laquerrière P., Lanza F., de la Salle H., Gachet C., Eckly A., International Society on Thrombosis and Haemostasis, 17-21 juillet 2021.

Collaborations

Danijela Vignjevic	UMR144/CNRS, Institut curie, Paris, France
Frédérique Gaits-Iacovoni	INSERM U1048, I2MC, Toulouse, France
Patrice Laquerrière	IPHC, CNRS, UMR 7178, Strasbourg, France
Steven Weiss	Life Sciences Institute, University of Michigan, USA
Sylvie Brassart-Pasco	UMR CNRS/URCA 7369, Reims, France

Introduction générale

Cadre général

Les plaquettes sanguines jouent un rôle vital dans le maintien de l'intégrité vasculaire et l'arrêt des saignements. Elles sont produites par les mégacaryocytes (MKs) eux-mêmes différenciés à partir des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse. Pour produire des plaquettes, les MKs subissent un processus complexe de différenciation et de maturation qui se déroule en deux étapes : 1) la mégacaryopoïèse, au cours de laquelle les progéniteurs se différencient en MKs matures et 2) la thrombopoïèse, lorsque les MKs traversent la barrière endothéliale des sinusoides pour libérer les plaquettes dans la circulation sanguine. Les travaux de recherche du laboratoire portent sur les dernières étapes de la mégacaryopoïèse et cherchent à **comprendre les mécanismes impliqués dans le passage des MKs au travers des sinusoides de la moelle osseuse**. Ma thèse s'inscrit dans cette thématique et vise à identifier les acteurs moléculaires impliqués dans la transmigration des MKs, notamment le cytosquelette d'acto-myosine, les intégrines et les métalloprotéases.

Organisation du manuscrit

La première section de ce manuscrit concerne **la revue bibliographique** composée de quatre chapitres. Le premier chapitre introduit la mégacaryopoïèse et les mécanismes de production plaquettaire. Nous présentons un schéma illustrant les principaux mécanismes de biogénèse des plaquettes sanguines. C'est également dans cette partie que nous détaillerons plus particulièrement le passage transendothélial des MKs. Le deuxième chapitre est dédié au microenvironnement de la moelle osseuse qui entoure les MKs. Le troisième chapitre est consacré aux intégrines, leurs fonctions cellulaires associées à la transmigration et leur participation, encore débattue, dans la thrombopoïèse. Dans le dernier chapitre, nous aborderons les podosomes, structure particulière d'adhésion et de dégradation de la matrice extracellulaire, que nous pensons impliqués dans le passage transendothélial. Les différentes références bibliographiques citées dans cette introduction sont répertoriées à la fin de ce document.

La deuxième section du manuscrit porte sur **mes résultats** obtenus au courant de la thèse et présente les trois axes de recherche relatifs à :

- 1) la compréhension de la nature des extensions émises par les MKs, en particulier leur organisation du cytosquelette (manuscrit accepté dans JTH en 2020)
- 2) l'évaluation du rôle des intégrines dans le passage des MKs au travers l'endothélium (manuscrit en cours de rédaction)
- 3) la contribution des métalloprotéases matricielles au passage de la lame basale (étude en cours).

Dans la troisième section, nous clôturerons cette thèse par une **conclusion générale**. Nous proposerons des **perspectives de travail, certaines présentant en lien avec la transfusion sanguine et les pathologies plaquettaires**.

Finalement, en annexe, figureront les trois autres publications actuellement parues c'est-à-dire la revue dans Platelets, le manuscrit méthodologique dans JoVE dont la vidéo sera prochainement disponible et l'article dans eLIFE.

Revue Bibliographique

La mégacaryopoïèse et la formation des plaquettes sanguines

1

Sommaire

1.1. Les plaquettes sanguines	2
1.1.1. Les plaquettes sanguines	2
1.1.2. L'hémostase primaire	3
1.1.3. La clairance des plaquettes	4
1.1.4. Les anomalies de la production plaquettaire.....	5
1.2 Le mégacaryocyte, le précurseur direct des plaquettes	6
1.2.1. Les mégacaryocytes se différencient dans la moelle osseuse	6
1.2.2. La maturation du mégacaryocyte.....	8
1.2.3. L'empéripolèse.....	10
1.2.4. Le franchissement de la barrière sinusoïdale.....	11
1.3. L'étape finale : la production plaquettes	15
1.3.1. La thrombopoïèse : les études <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	15
1.3.2. Le bourgeonnement membranaire des mégacaryocytes.....	18
1.3.3. Le rôle du poumon dans la biogénèse des plaquettes	19

L'hémostase primaire est un processus physiologique essentiel qui concourt à l'arrêt des saignements et dans lequel les plaquettes sanguines jouent le rôle principal. Un nombre insuffisant de plaquettes, ou la présence de plaquettes non fonctionnelles, peut ainsi être associé à un risque hémorragique important. La connaissance des mécanismes de différenciation des MKs (mégacaryopoïèse), précurseurs des plaquettes, et des mécanismes de formation des plaquettes (thrombopoïèse) est donc d'un grand intérêt médical. Une meilleure compréhension de ces mécanismes permettrait de mieux caractériser l'origine de certaines maladies plaquettaires et d'identifier des traitements appropriés. Ceci aiderait également à optimiser la production de plaquettes *in vitro* en vue, par exemple, de prévenir des états réfractaires en transfusion (inefficacité transfusionnelle due à la présence chez le receveur d'allo-anticorps conduisant à l'élimination des plaquettes transfusées)^{1,2}.

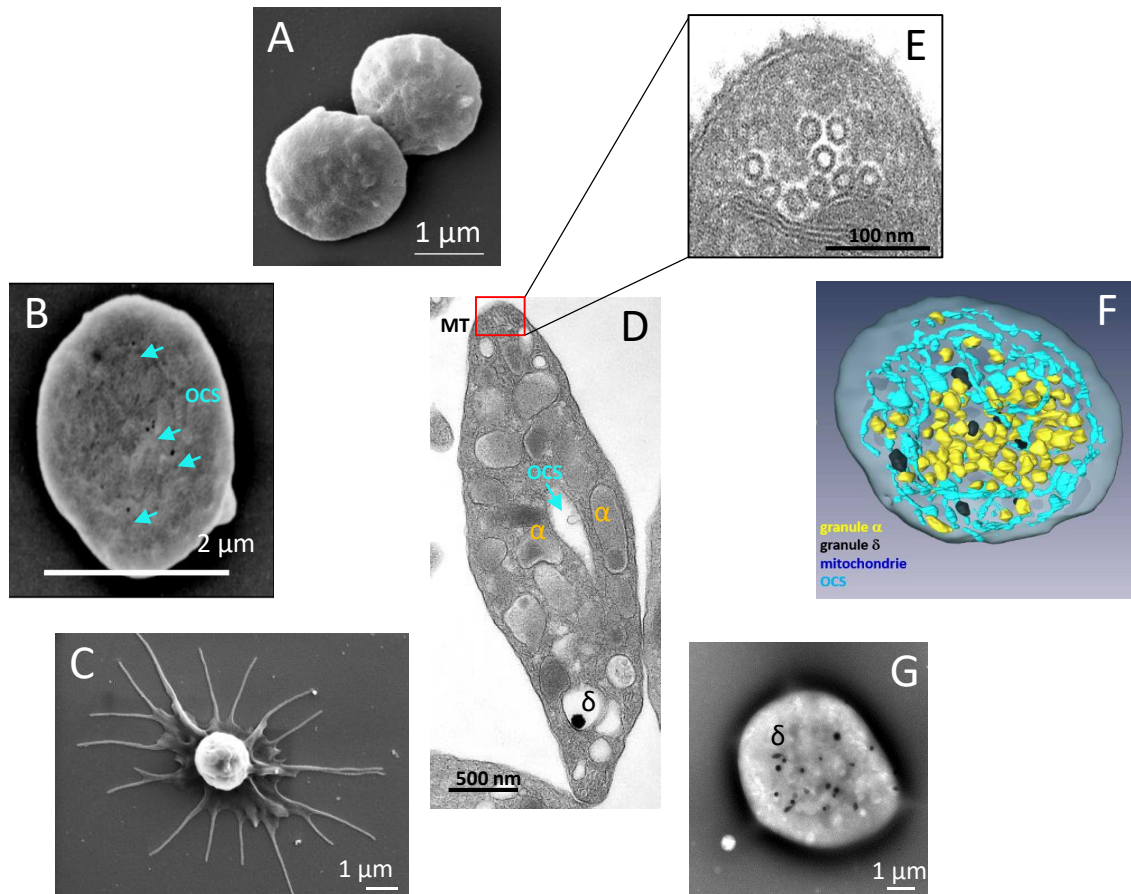


Figure 1 : La plaquette sanguine sous toutes ses formes.

(A et B) Aspect discoïde des plaquettes circulantes visualisées par MEB et illustrant, à leur surface, les ouvertures correspondant à l'invagination du système canaliculaire ouvert (OCS). (C) Une plaquette activée émettant des filopodes visualisées en MEB. (D) Image représentative d'une plaquette observée par MET indiquant les granules α et δ , la bande marginale de microtubules (MT) et l'OCS. (E) Détail des enroulements de microtubules formant la bande marginale en MET. (F) Reconstitution 3D d'une plaquette au repos à partir d'une acquisition au microscope FIB-SEM. (G) Technique du « *whole-mount* » d'une plaquette humaine en MET permettant une quantification des granules δ . D'après l'UMR_S1255.

1.1. Les plaquettes sanguines

1.1.1. Les plaquettes sanguines

Les plaquettes sanguines sont des fragments cellulaires anucléés de forme discoïde d'environ 3 µm de diamètre chez l'Homme. En moyenne, 150 à 400 milliards de plaquettes par litre de sang circulent chez l'homme (1 000 milliards chez la souris). Leur durée de vie étant de quelques jours (8 jours chez l'Homme, 4 jours chez la souris), cent milliards de plaquettes sont produites quotidiennement afin de maintenir une numération sanguine constante. Par leurs propriétés d'adhérence et d'agrégation, elles sont capables d'**assurer l'arrêt rapide d'un saignement** au niveau d'un site de lésion vasculaire et de **maintenir l'intégrité vasculaire**³. Cependant leur fonction ne se limite pas à l'hémostase primaire, elles interviennent également dans l'angiogenèse, l'inflammation, la réaction immunitaire innée, le processus métastatique, et les maladies infectieuses virales⁴. Récemment, il a été montré que les plaquettes étaient impliquées dans le syndrome de détresse respiratoire de certains patients atteints de la covid-19 présentant une thrombose pulmonaire⁵⁻⁷. Enfin l'arrivée de la vaccination et notamment du vaccin ChAdOx1 nCov-19 a mis en lumière de rares cas de thromboses dont l'origine pourrait être la production d'auto-anticorps anti-PF4 (*platelet factor 4*) et la formation de réaction auto-immune de type HIT⁸ (*heparin-induced thrombocytopenia*).

Morphologie des plaquettes. Au repos, la plaquette se présente comme un petit disque ([Figure 1](#)) dont la forme est maintenue par des enroulements de microtubules, appelé bande marginale et présent sous la membrane plasmique. Leur membrane plasmique présente de nombreux pores correspondant à des invaginations membranaires. C'est le système canaliculaire ouvert (OCS, *open canalicular system*) qui constitue une réserve membranaire utilisée lors du changement de forme des plaquettes au cours de leur activation. Les plaquettes contiennent également des granules spécifiques, notamment (1) les granules α contenant des molécules impliquées dans l'hémostase telles que le facteur Willebrand (FW), le fibrinogène, des facteurs de croissance, des facteurs pro- et anti-angiogéniques, des médiateurs de l'inflammation et des enzymes parmi lesquelles les métalloprotéases^{9,10} et (2) les granules δ ou denses, appelés ainsi car ils sont denses aux électrons en microscopie électronique (ME), et contenant du calcium, des nucléotides comme l'adénosine diphosphate (ADP) et l'adénosine triphosphate (ATP), des pyrophosphates et de la sérotonine¹¹. En raison

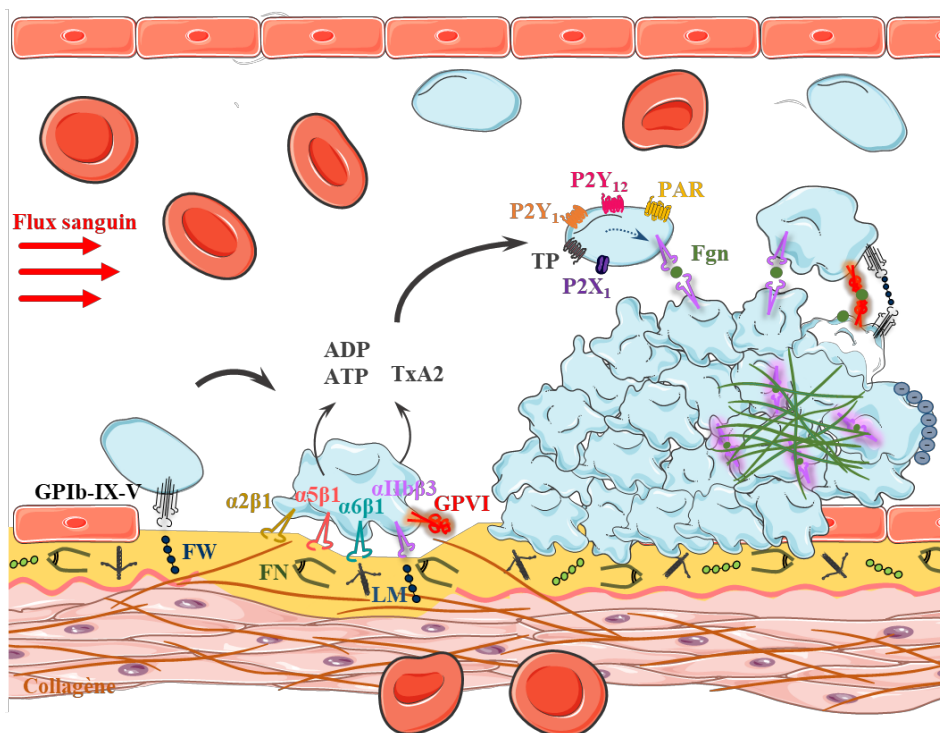


Figure 2 : Les plaquettes dans l'hémostase primaire.

La plaquette permet l'hémostase primaire, c'est-à-dire le maintien de l'intégrité des vaisseaux et l'arrêt des saignements en cas de lésion du vaisseau. Pour cela les plaquettes adhèrent à la matrice sous endothéliale, s'activent et changent de forme afin d'agréger et de former un clou plaquettaire.

ADP, adénosine diphosphate; ATP, adénosine triphosphate; Fgn, fibrinogène; FN, fibronectine; FW, facteur Willebrand; GP, glycoprotéine; LM, laminines; PAR, *protease-activated receptor* ; TP, récepteur au thromboxane et aux prostaglandines; TxA2, thromboxane A2.

D'après Muhammad Usman Ahmed, UMR_S1255.

de leurs petites tailles, la ME est un outil de choix pour caractériser l'ultrastructure des plaquettes (Figure 1). Au laboratoire, nous bénéficions de plusieurs approches de ME complémentaires permettant d'identifier différentes anomalies présentes dans des plaquettes de patients^{12,13} ou de souris génétiquement modifiées¹⁴⁻¹⁷. Il s'agit notamment de la microscopie électronique à transmission (MET) sur coupes pour l'étude de l'ultrastructure ou sur plaquettes humaines entières, « *Whole mount* », pour la quantification des granules δ ; la microscopie électronique à balayage (MEB) pour déterminer de degré d'activation plaquettaire (exemple : Score de Kunicki) et le *Focused-Ion Beam Scanning electron microscope* (FIB-SEM) pour la distribution 3D des organites plaquettaires (Figure 1).

1.1.2. L'hémostase primaire.

Les mécanismes cellulaires de l'hémostase primaire. L'hémostase, qui constitue la fonction majeure des plaquettes, fait intervenir plusieurs éléments : le vaisseau, les plaquettes et des facteurs plasmatiques tels que le fibrinogène, les protéines de la coagulation et le FW. Suite à une lésion vasculaire, des protéines adhésives de la matrice sous endothéliale sont exposées à la circulation sanguine, notamment le collagène et FW. Une vasoconstriction réflexe du vaisseau permet de limiter la perte de sang dans les petits vaisseaux. Dans des conditions de flux élevé, le FW présent dans la matrice sous-endothéliale ou provenant du plasma se déploie en conformation active et lie le collagène. Le FW ainsi fixé au site de lésion va recruter les plaquettes circulantes par l'interaction avec son récepteur multimoléculaire plaquettaire : le complexe glycoprotéique GPIb-IX-V^{18,19}. Les plaquettes sont alors ralenties, puis adhèrent de manière stable à la matrice sous endothéliale, s'activent et changent de forme en se contractant et en émettant des filopodes. Les plaquettes activées sécrètent le contenu de leurs granules α et δ , recrutant d'autres plaquettes. Enfin les plaquettes agrègent entre-elles par la liaison du fibrinogène à l'intégrine $\alpha IIb\beta$, résultant en la formation d'un clou plaquettaire. Le clou plaquettaire est stabilisé par un réseau de fibrine insoluble qui résulte de la polymérisation du fibrinogène soluble catalysée par la thrombine, elle-même générée par l'activation des protéines de la coagulation. Le résultat de cette série d'étapes est la formation du « clou hémostatique » permettant l'arrêt des saignements (Figure 2).

Le complexe GPIb-IX-V. Ce complexe est spécifiquement exprimé à la surface des plaquettes (~25.000 copies par plaquette)²⁰. Il est composé de quatre glycoprotéines transmembranaires, GPIb α (135 kDa), la GPIb β (encore appelée CD42c, 26 kDa), la GPIX (20 kDa) et la GPV (82 kDa), appartenant à la famille des protéines riches en leucine¹⁹. L'importance de ce complexe dans l'hémostase est attestée par l'existence d'une maladie hémorragique, le syndrome de Bernard-Soulier qui est la conséquence d'une absence d'expression ou d'une anomalie fonctionnelle de l'une des sous-unités GPIb ou GPIX. Cette anomalie se traduit par une macrothrombopénie, c'est-à-dire une diminution du nombre de plaquettes qui sont de plus grandes tailles²¹. Le syndrome de Bernard-Soulier est une maladie extrêmement rare à transmission autosomique récessive. La thrombopathie due aux mutations du complexe GPIb-IX entraîne un défaut d'adhérence plaquettaire par défaut de liaison au FW. Ces patients ont un temps de saignement allongé et des hémorragies sévères sont possibles.

Le complexe α IIb β 3. Ce récepteur qui joue un rôle essentiel dans l'agrégation plaquettaire est un récepteur multimoléculaire composé de α IIb (encore appelé CD41, 136 kDa) et β 3 (CD61, 100 kDa), appartenant à la famille des intégrines. Ce complexe est exprimé en grande quantité à la surface plaquettaire (~80.000 copies par plaquette). Un déficit sévère ou un dysfonctionnement de ce complexe est à l'origine de la thrombasthénie de Glanzmann, une maladie hémorragique héréditaire récessive^{22,23}. Le défaut fonctionnel des plaquettes par défaut d'agrégation au fibrinogène en résultant peut conduire à des hémorragies sévères. Ces patients seront détaillés dans le chapitre 3 relatif aux intégrines.

1.1.3. La clairance des plaquettes

Les plaquettes ne circulant que 7 à 10 jours, il existe une régulation entre leur production dans la moelle osseuse et leur élimination en périphérie afin de maintenir un compte plaquettaire constant. Cet équilibre est finement régulé par la thrombopoïétine (TPO), une cytokine clé de la mégacaryopoïèse (Cf 1.2.1). Des études de recirculation de plaquettes chez l'homme utilisant des marquages à l'Indium¹¹¹ ou au Chrome⁵¹ ont permis de mettre en évidence une séquestration de près d'un tiers des plaquettes dans la rate et dans le foie^{24,25}. Nous savons aujourd'hui que la clairance fait intervenir deux mécanismes distincts, d'une part une voie apoptotique²⁶ et d'autre part des modifications phénotypiques se produisant au cours de leur senescence²⁷. Le groupe de B. Kile a proposé en 2007 le modèle « d'horloge moléculaire » pour expliquer la régulation de la durée de vie des plaquettes dans la circulation²⁶. Ce modèle

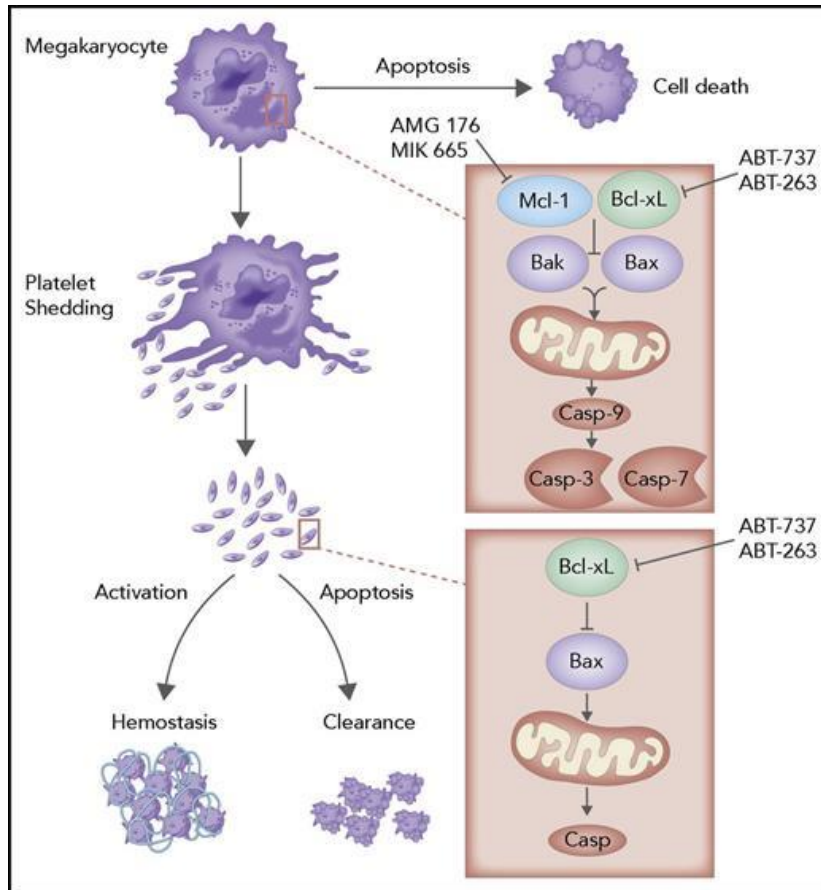


Figure 3 : Le rôle de l'apoptose dans la biologie des mégacaryocytes et des plaquettes.

Les mégacaryocytes possèdent des voies d'apoptose intrinsèque médiée par BAK/BAX et extrinsèque inducible par FasL. Ces deux voies doivent être limitées pendant la croissance et le développement des mégacaryocytes afin de permettre la production de plaquettes. L'apoptose des mégacaryocytes peut être déclenchée en réponse à des stress physiopathologiques tels que la chimiothérapie ou l'infection. Une fois que les plaquettes sont libérées dans la circulation, leur durée de vie est régulée par la voie de l'apoptose intrinsèque. Bcl-xL est le médiateur essentiel de la survie des plaquettes. D'après McArthur et al., 2018

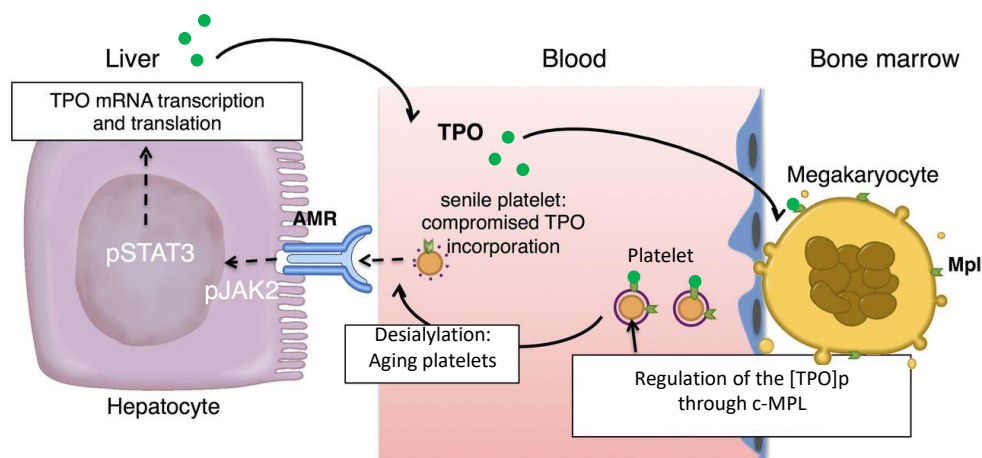


Figure 4 : Boucle de régulation de la thrombopoïétine, production et sénescence des plaquettes.

Les cellules hépatiques produisent la thrombopoïétine (TPO) qui est libérée dans le sang. La TPO circulante est captée par les cellules souches hématopoïétiques et mégacaryocytes en stimulant la mégacaryopoïèse. Les plaquettes ainsi produites capturent également la TPO, participant à la régulation de sa concentration plasmatique. Enfin, la plaquette âgée incorpore peu de TPO et perd ses résidus sialylés, elle est reconnue par le récepteur Ashwell-Morell des hépatocytes lors de son passage dans le foie. Son élimination stimule ainsi la transcription du gène de la TPO et stimule la mégacaryopoïèse. Adapté d'après Grozovsky et al., 2015.

repose sur l'équilibre entre les protéines pro-apoptotiques BAX/BAK et anti-apoptotiques de la famille *B-cell lymphoma 2* (BCL-2, BCL-XL, MCL-1, ...) ²⁸ (Figure 3). Les modifications phénotypiques concernent essentiellement la perte en acides sialiques lors du vieillissement des plaquettes. En 2015, K. Hoffmeister et ses collaborateurs décrivent les mécanismes moléculaires menant à l'élimination des plaquettes ²⁹. Ainsi, lors du passage hépatique, les plaquettes désialylées exposant des résidus β -galactose seraient alors reconnues par les récepteurs Ashwell-Morell (AMR) exprimés à la surface des hépatocytes ainsi que cellules de Kupffer, les macrophages hépatiques, et seraient éliminées par phagocytose par ces dernières ^{30,31}. La reconnaissance par les récepteurs AMR des hépatocytes déclencherait également une signalisation par la voie JAK2/STAT3 permettant l'expression de l'ARN message de la TPO, et formant ainsi une boucle d'auto-régulation de la production plaquettaire (Figure 4).

1.1.4. Les anomalies de la production plaquettaire

Certaines pathologies humaines sont associées à des défauts de nombre de plaquettes (thrombopénies) de différents degrés : thrombopénie légère (150-100 000 plaquettes/ μ L), modérée (100-40 000 plaquettes/ μ L) ou sévère (<40 000 plaquettes/ μ L). Cette diminution de la numération plaquettaire peut s'expliquer par deux phénomènes : une thrombopénie d'origine centrale c'est-à-dire un défaut de production des plaquettes ou une thrombopénie périphérique c'est-à-dire une élimination accrue des plaquettes circulantes. La boucle d'auto-régulation de la production plaquettaire permet de discriminer ces deux phénomènes par simple dosage de la TPO circulante (Figure 4). Si le niveau de TPO circulante est plus élevé que la normale, cela indique une thrombopénie centrale puisqu'il n'y a pas assez de plaquettes produites pour capter la TPO circulante. Si le niveau de TPO est normal, cela indique une élimination des plaquettes après la liaison de la TPO donc une thrombopénie périphérique (Cf. paragraphe ci-dessous 1.2.1) ^{32,33}.

Les anomalies de la production plaquettaire peuvent être soit acquises, résultant d'un état pathologique ou d'un traitement médical, soit d'origine héréditaire, on parle alors de **thrombopénie constitutionnelle** ³⁴. Ces formes génétiques peuvent être transmises de manière héréditaire par les parents ou alors découler d'une mutation *de novo*. Certaines formes sont également associées à d'autres anomalies congénitales ou à des déficits immunitaires, on parle alors de formes syndromiques ³⁵. Une vingtaine de gènes ont été

décrits actuellement comme responsables de ces thrombopénies³⁶⁻³⁸. Les variants à l'origine des thrombopénies constitutionnelles agissent à des phases distinctes de la mégacaryopoïèse et présentent diverses manifestations cliniques et anomalies plaquettaires. Une des difficultés majeures de ces pathologies est d'orienter ces patients vers les études génétiques permettant de poser un diagnostic précis. Une étude internationale indique qu'environ 14 000 patients par an bénéficient d'une exploration génétique, et l'anomalie génique à l'origine de la maladie est retrouvée dans 50 % des cas^{35,39}.

1.2 Le mégacaryocyte, le précurseur direct des plaquettes

Les plaquettes sanguines proviennent de grandes cellules, jusqu'à 50 µm de diamètre, appelées mégacaryocytes (du latin : méga : grand, caryo : noyau, cyte : cellule), qui ont été décrites pour la première fois en 1890 par Howell⁴⁰. Si le rôle du MK dans la formation des plaquettes proposé par Wright en 1906 a été rapidement admis, les questions du mécanisme et du lieu de leur production sont encore actuellement débattues⁴¹. Les MKs sont des cellules rares, représentant moins de 0,01% des cellules nucléées de la moelle osseuse. Ces cellules acquièrent des caractéristiques spécifiques au cours de leur différenciation et de leur maturation, désignées sous le terme « mégacaryopoïèse ». Chez l'homme adulte, la mégacaryopoïèse est principalement localisée au niveau de la moelle osseuse rouge des os plats (côtes, sternum, os du pelvis) alors que chez la souris adulte l'hématopoïèse se situe principalement dans les os longs comme le fémur.

1.2.1. Les MKs se différencient dans la moelle osseuse

De la cellule souche hématopoïétique vers le MK mature. A l'origine de la mégacaryopoïèse, il y a la **cellule souche hématopoïétique (CSH)** qui possède la propriété d'autorenouvellement (aptitude à se reproduire sans se différencier), de multipotence (capacité à donner naissance à toutes les cellules différenciées du sang) et la capacité de migrer. Les CSH en quiescence se localisent préférentiellement à la niche ostéoblastique. Dès leur engagement vers la différenciation, elles migrent vers la niche vasculaire, territoire de l'hématopoïèse⁴². Ces cellules possèdent des marqueurs de surface spécifiques que l'on peut cibler afin de les isoler, de les cultiver et les différencier pour des expériences *in vitro*. Chez l'homme, le principal marqueur des CSH est l'expression de l'antigène CD34 qui, en combinaison avec les marqueurs

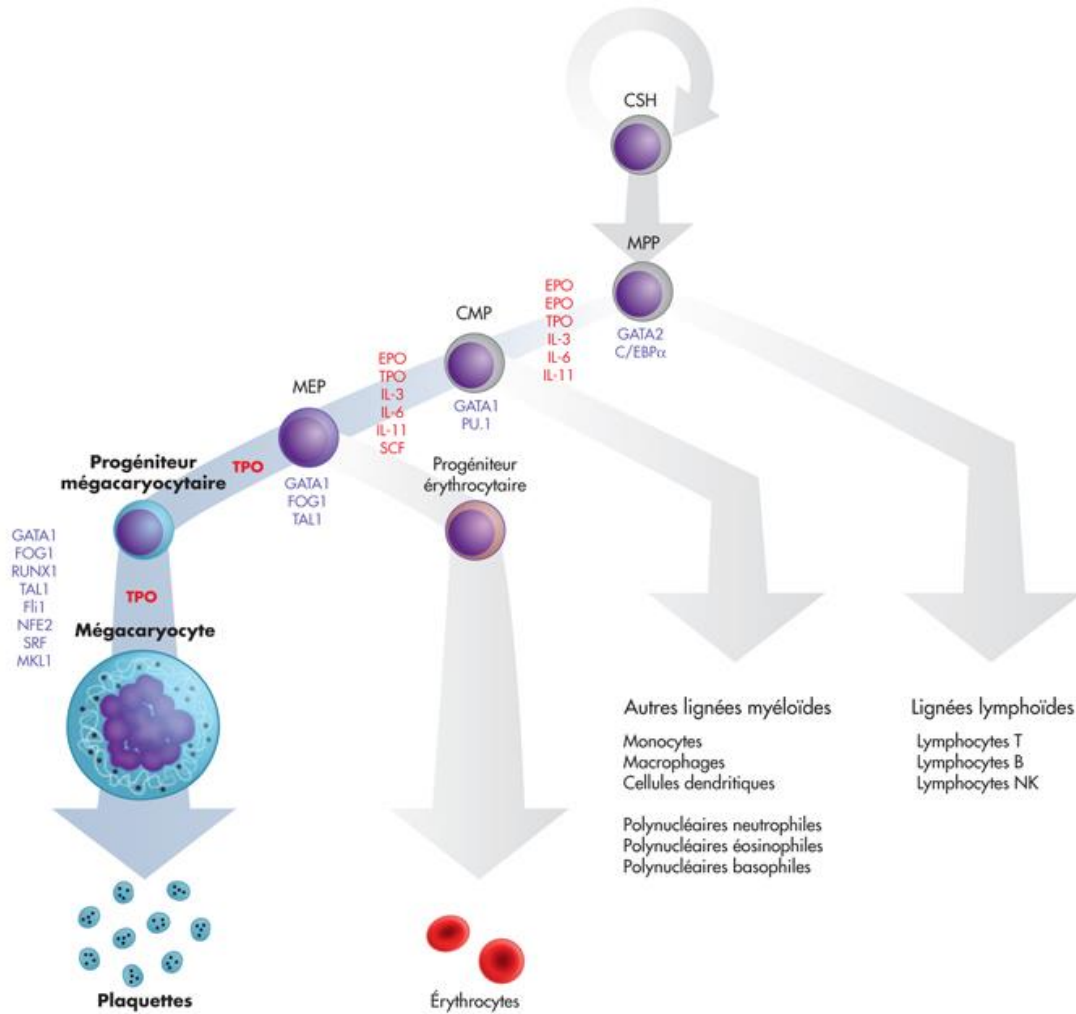


Figure 5 : L'engagement de la lignée mégacaryocytaire dans l'hématopoïèse.

Lors de sa différenciation en mégacaryocyte, la cellule souche hématopoïétique (CSH) passe par des stades successifs de multipotence constituant les embranchements des différentes lignées myéloïdes. Certaines cytokines régulant cette différenciation sont indiquées en rouge et les principaux facteurs transcriptionnels impliqués sont indiqués en bleu. MPP : MultiPotent Progenitor; CMP : Common Myeloid Progenitor ; MEP : Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor ; EPO : Erythropoïétine ; TPO : Thrombopoïétine ; SCF : Stem Cell Factor ; IL-3/6/11 : Interleukine 3/6/11 . D'après Léon et al., 2015.

Lin⁻ CD90⁺ CD38⁻, permet d'isoler directement les CSH humaines⁴³. Sous l'influence de différents facteurs environnementaux, la CSH se différencie progressivement en progéniteurs de plus en plus orientés vers une lignée spécifique. L'utilisation de tests de clonalité ont permis à N. Debili et collaborateurs de démontrer l'existence d'un progéniteur érythroïde/mégacaryocytaire bipotent humain (MEP), co-exprimant les marqueurs des deux lignées et répondant aux facteurs de transcription spécifiques des deux lignées⁴⁴. L'engagement des CSH et l'expansion cellulaire menant à ces progéniteurs bipotents MEP se déroulent principalement sous l'effet de l'érythropoïétine (EPO), les interleukines IL-3 et IL-6 ainsi que le *stem cell factor* (SCF). La différenciation des MEPs en progéniteurs mégacaryocytaires est induite par l'expression de gènes spécifiques à cette lignée tels que RUNX1, FLI1 et NFE2³⁷ (Figure 5).

Régulation de la mégacaryopoïèse. La TPO, produite essentiellement dans le foie, constitue le principal facteur de croissance favorisant la prolifération et l'engagement des CSH vers la lignée mégacaryocytaire^{45,46}. Cette cytokine est un régulateur important qui se lie au récepteur MPL. Les souris invalidées pour le gène de la *tpo* (*Thpo*^{-/-}) présentent une thrombopénie modérée secondaire à une diminution des MKs dans la moelle⁴⁷. Dans la circulation, elle est captée par les plaquettes circulantes et les MKs matures qui expriment tous les deux le récepteur de la TPO c-Mpl (cellular-Myeloproliferative leukemia). Comme évoqué ci-dessus, la production de TPO est directement régulée par la masse plaquettaire : un nombre accru de plaquettes lie la TPO et décroît la quantité de TPO disponible pour stimuler la mégacaryopoïèse; inversement une thrombopénie périphérique entraîne une régulation positive par la TPO^{32,46} (Figure 4).

Les temps précoces de différenciation sont contrôlés par des facteurs pléomorphes tels que l'interleukine 3 (IL-3) et le *stem cell factor* (SCF). Les étapes tardives de maturation sont influencées par des facteurs tels que le *leukemia inhibitory factor* (LIF), l'IL-6 et l'IL-11. La mégacaryopoïèse est également régulée au niveau transcriptionnel. Plusieurs **facteurs de transcription** ont été décrits. Parmi les plus importants, on peut citer GATA-1 qui, en association avec son cofacteur FOG-1, est essentielle pour la différenciation érythroïde-mégacaryocytaire⁴⁸. Le proto-oncogène *Friend Leukemia Integration 1* (FLI1) et GATA1 activent des gènes spécifiquement responsables de la régulation de la mégacaryopoïèse tardives⁴⁹. Le facteur de transcription RUNX1 favorise la prolifération des progéniteurs et

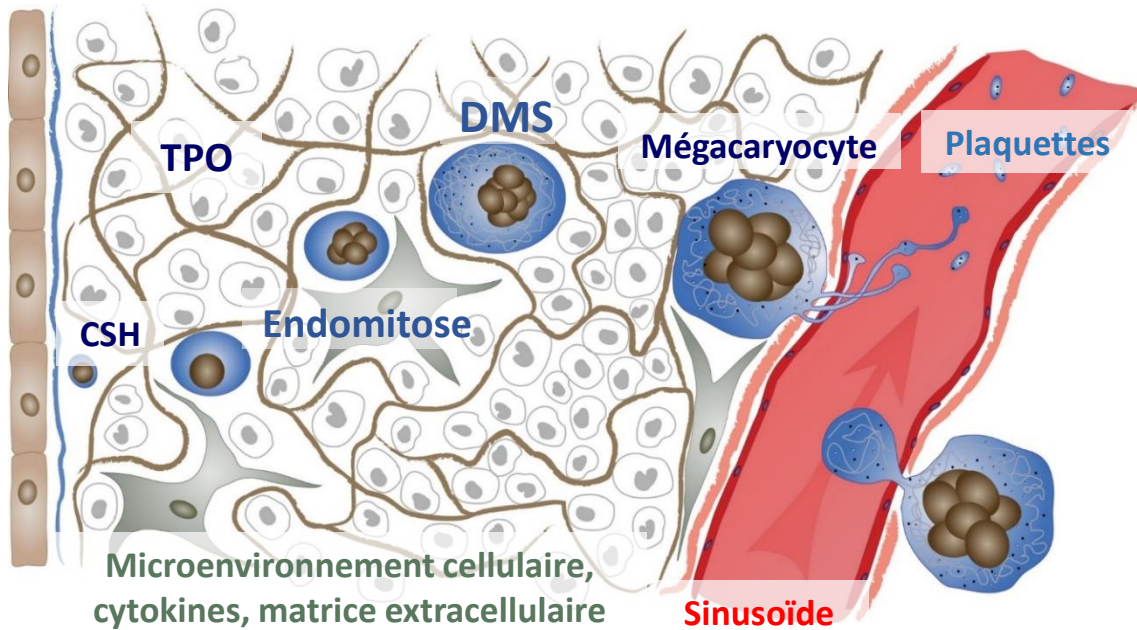


Figure 6 : De la mégacaryopoïèse à la libération des plaquettes sanguines.

Sous l'effet de cytokines (TPO) et du microenvironnement cellulaire et matriciel, la cellule souche hématopoïétique (CSH) amorce sa différenciation en mégacaryocyte. Elle subit un processus d'endomitose lui conférant un noyau polylobé, augmente en taille, développe ses granules et un réseau de membranes invaginées appelées DMS. Le mégacaryocyte mature émet, dans le sinusöide, des fragments cytoplasmiques qui se remodelent en plaquettes sanguines. D'après Nathalie Brouard, UMR_S1255.

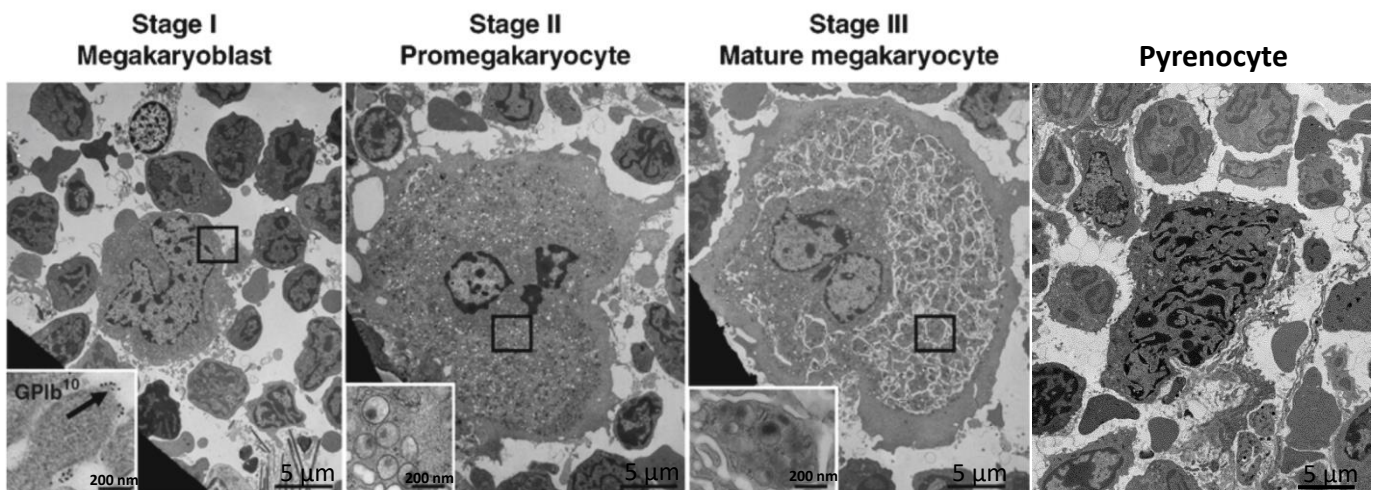


Figure 7 : Les différents stades de maturation du mégacaryocyte.

Les mégacaryocytes sont classés en quatre stades de maturation : Stade I, un mégacaryocyte immature de 10 à 15 μm de diamètre avec un noyau bilobé occupant une large proportion du cytoplasme. Stade II, un mégacaryocyte de 15 à 30 μm de diamètre contenant un noyau multilobé, des granules α et denses et le DMS en cours de développement. Stade III, un mégacaryocyte mature 30 à 50 μm de diamètre contenant un noyau multilobé, des granules plaquettaires, un réseau important de membrane de démarcation (DMS) délimitant des territoires cytoplasmiques et une zone périphérique dénuée d'organites. Pyrénoocyte, un mégacaryocyte sénescant correspondant à un noyau nu entouré d'un fin liseré cytoplasmique. Modifié, d'après Eckly et al., 2012.

module les étapes tardives de la maturation de la mégacaryopoïèse. Le facteur nucléaire érythroïde 2 (NFE2) est impliqué dans la maturation tardive des MKs^{50,51} (Figure 5).

1.2.2. La maturation du MK. La maturation du MK est marquée par deux mécanismes biologiques quasiment uniques parmi les différents modèles de différenciation chez les mammifères : (1) la polyploïdisation du MK par un processus appelé **endomitose** et (2) le développement extraordinaire d'un réseau de membranes internes appelé **membranes de démarcation (DMS, demarcation membrane system)**. L'ensemble des processus de maturation nucléaire et cytoplasmique dure environ 8 jours au terme desquels les plaquettes sont libérées dans la circulation sanguine⁵²⁻⁵⁴. A terme, on estime qu'un MK donne naissance à plusieurs milliers de plaquettes sanguines (Figure 6).

Les stades de maturation du MK. Il est possible de classer les **MKs en 4 stades successifs**, leur conférant une ultrastructure caractéristique pour chaque stade : mégacaryoblaste (stade I), promégacaryocyte (stade II), mégacaryocyte (stade III) et pyrénocyte correspondant au MK sénescant⁵⁵ (Figure 7). Les MKs de stade I mesurent entre 10 et 15 μm , ont un rapport nucléocytoplasmique élevé et ne possèdent pas de granules. En stade II, ils mesurent entre 15 et 25 μm et leurs noyaux sont multilobés. Ces cellules sont riches en mitochondries, en réticulum endoplasmique rugueux et comportent un appareil de Golgi très développé, permettant la synthèse massive de protéines plaquettaires et la biosynthèse des lipides nécessaires à la formation des membranes⁵⁶. C'est également au cours de ce stade que les MKs commencent à exprimer les récepteurs membranaires spécifiques à la lignée plaquettaire (tels que $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, GPIb-IX-V et GPVI) et qu'apparaissent les granules sécrétoires spécifiques à la lignée plaquettaire, les granules α et denses^{57,58}. Les corps multivésiculaires (MVB), précurseurs directs des deux types de granules, sont largement représentés dans ces MKs^{59,60}. Lors du stade III, le MK est mature et mesure entre 25 et 50 μm . Il est caractérisé par 3 zones : 1) une zone nucléaire comportant **le noyau polylobé**, 2) une zone intermédiaire cytoplasmique riche en organelles et en **DMS**, et 3) **une zone périphérique** dépourvue d'organelles et riche en cytosquelette d'acto-myosine. Le MK sénescant, ou pyrénocyte, contient le noyau polylobé avec un fin liseré de cytoplasme résultant de l'émission de toute la masse cytoplasmique au travers des sinusoides.

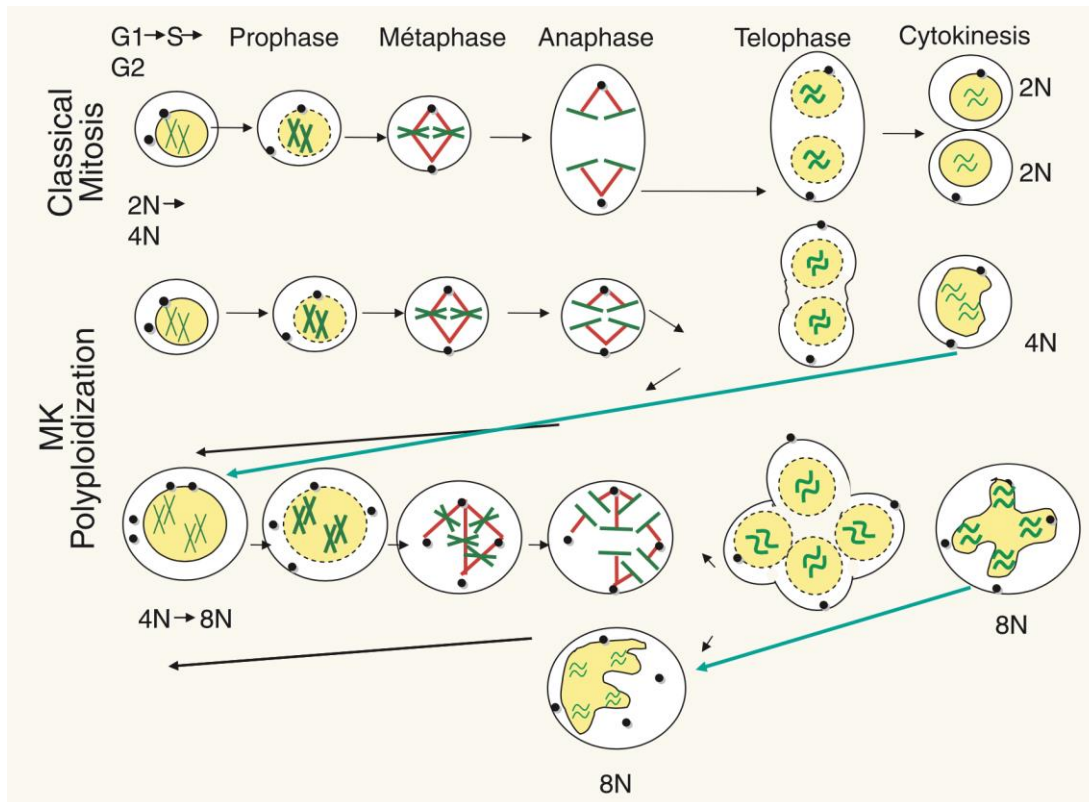


Figure 8 : L'endomitose dans la maturation du mégacaryocyte.

Le mégacaryocyte réplique son ADN (phase S) avant d'entrer en prophase puis en métaphase classique. Au cours de l'anaphase, la cytokinèse est avortée et n'aboutit pas à la séparation classique de la cellule en deux cellules filles. La cellule refusionne et devient polypléide gardant ainsi une seule membrane nucléaire. D'après Chang et al., 2007.

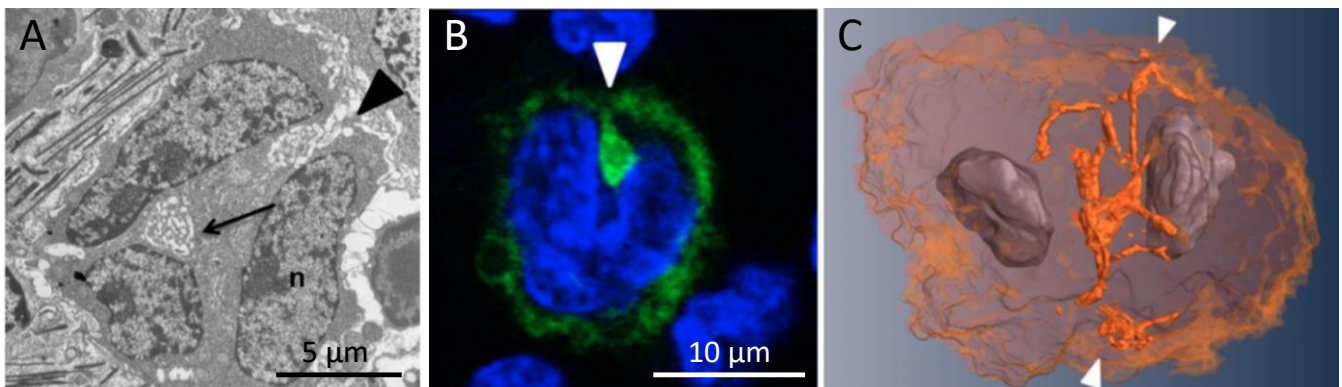


Figure 9 : Les étapes précoces de développement du DMS.

(A) Pré-DMS visualisé en microscopie électronique à transmission dans un mégacaryocyte immature (flèche et tête de flèche), n: noyau. (B) Pré-DMS visualisé en vert (GPIIb) par microscopie confocale dans un mégacaryocyte immature dont les lobes nucléaires apparaissent en bleu (DAPI). (C) Structure tridimensionnelle d'un mégacaryocyte bilobé. Le pré-DMS visualisé en orange est localisé entre les lobes nucléaires et est en continuité avec la membrane plasmique. Adapté d'après Eckly et al., 2014.

Le noyau polylobé. L'endomitose est un processus original qui va aboutir à la formation du noyau polylobé et polyploïde (jusqu'à 128N), si caractéristique du MK⁶¹. Au cours de l'endomitose, les MKs vont amorcer une mitose et dupliquer leur matériel génétique sans aboutir à leur division nucléaire et cellulaire. La cytokinèse est avortée et la membrane nucléaire se reforme aboutissant à une cellule bilobée 4N. Plusieurs endomitoses successives conduisent le MK à atteindre une polyploïdisation allant jusqu'à 128N. Il en résulte une cellule géante contenant un noyau unique plurilobé^{56,62-65} (Figure 8). La **cytokinèse avortée** est due à un défaut de formation de l'anneau contractile d'actomyosine régulé par RhoA et nécessaire au clivage des deux cellules filles⁶⁶. Au niveau moléculaire, la transition entre la mitose et l'endomitose fait intervenir une répression de l'expression de la myosine IIB par le facteur de transcription RUNX1 et une anomalie dans la signalisation de la voie Rho/Rock. Ainsi, l'inhibition de l'activité de RhoA entraîne une diminution de l'accumulation d'actine au niveau de l'anneau contractile qui, couplée à une diminution d'expression de la myosine IIB, serait responsable de la cytokinèse incomplète^{61,67}.

Les membranes de démarcation (DMS). Le DMS est une autre caractéristique singulière de la lignée mégacaryocytaire. Au cours de la maturation, le DMS se développe de manière extraordinaire entre le stade de MK immature de stade I et celui de stade III délimitant des territoires cytoplasmiques, puisque la quantité de membrane augmente de 26 fois en l'espace de 72h^{54,68}. On parle de système des membranes de démarcation car il découpe le cytoplasme en petits territoires qui, à l'origine, étaient appelés territoires « plaquettaires »^{69,70}. Ce concept implique toutefois que les "plaquettes préformées" cytoplasmiques soient entourées de microtubules enroulés, ce qui n'a jamais été visualisé. En 1982, Radley et Haller démontreront que **ces membranes approvisionnent les membranes plasmiques des futures plaquettes** et constituent ainsi un réservoir pour la formation des plaquettes. Ce réseau de membranes est en continuité avec la membrane plasmique du MK^{53,71} et ce sont les protéines contenant un domaine F-BAR, PACSIN2 et CIP4, qui régulent les invaginations tubulaires⁷². La filamine A (FLNA) interagit avec PACSIN2, pour assurer sa localisation correcte aux sites de tubulation membranaire⁷³. Au laboratoire, la combinaison de plusieurs approches de microscopie nous a permis de caractériser les premières étapes de formation du réseau de membranes de démarcation (pré-DMS) des MKs⁷⁴ (Figure 9). Cette étude a révélé que le pré-DMS est initialement formé par une invagination de la membrane plasmique puis alimenté

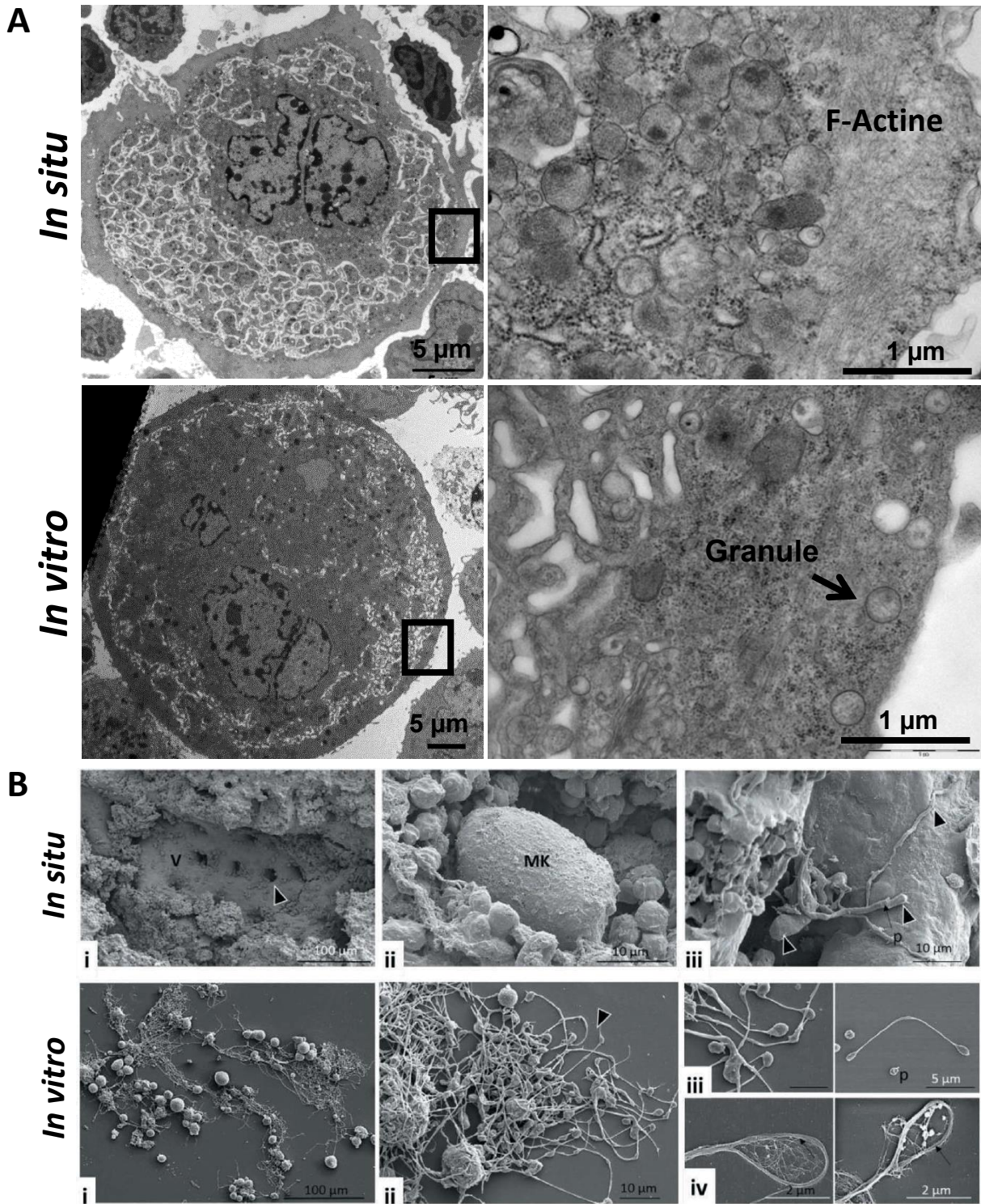


Figure 10 : Comparaison *in situ* vs *in vitro* de la morphologie des MKs observés par MET (A) et MEB (B).

(A) Le MK mature *in situ* possède une zone d'actine périphérique qui maintient le DMS et les granules. A l'inverse, le MK de culture *in vitro* ne possède pas de zone périphérique et des granules sont visibles jusqu'à la membrane plasmique. Les MKs de culture *in vitro* ont un DMS sous-développé. D'après l'UMR_S1255, Eckly A. (B) Différence d'aspect entre les prolamelles *in vitro* et *in situ*. Ainsi, les MKs observés en SEM *in situ* émettent quelques protrusions comparés au MKs de culture *in vitro* qui émettent de nombreuses prolamelles organisées en colliers de perles. D'après Scandola et al., 2020.

par l'apport de membranes supplémentaires pour permettre son expansion via les vésicules golgiennes et le contact du réticulum endoplasmique⁷⁴.

Un développement anormal du DMS et de son organisation en territoires cytoplasmiques entraîne une diminution du nombre de plaquettes ou du nombre de proplaquettes formées par le MK. C'est notamment le cas pour des mutations de gènes humains conduisant à certaines pathologies (syndrome de Bernard-Soulier, maladies liées à MYH9) ou des délétions de gènes murins (*Gp1ba*, *Gp1bb*, *Gp9*, *FlnA*, small Rho GTPase)⁷⁵. Le DMS conditionne ainsi directement la quantité de membranes disponibles pour la formation de plaquettes.

La zone périphérique du MK mature. A la jonction du compartiment cytoplasmique et de la membrane plasmique se trouve une zone particulière contenant de l'actine filamenteuse et entourant tout le MK, c'est **la zone périphérique**. Étonnamment, il n'existe actuellement que très peu de données concernant cette zone périphérique. Ceci est probablement dû au fait que cette zone est totalement absente dans les MKs cultivés *in vitro*, la source de MKs la plus couramment utilisée dans la littérature (Figure 10A). De par sa localisation et sa richesse en actine, la zone périphérique pourrait jouer le rôle de barrière permettant de maintenir le DMS en place jusqu'à ce que le MK soit suffisamment mature pour libérer les plaquettes⁷⁶⁻⁷⁸. C'est aussi par l'intermédiaire de cette zone que les MKs entrent en contact avec les microvaisseaux, ce qui laisse à penser qu'elle pourrait jouer un rôle stratégique à leur passage. Il reste beaucoup à découvrir concernant la zone périphérique, et ceci sera abordé dans l'axe 1 de mes résultats.

1.2.3. L'empéripolèse. Au cours de l'étude des moelles osseuses de souris déficientes en intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ (Cf. Axe 2 des résultats), nous avons constaté que les MKs de ces souris présentaient de l'empéripolèse, c'est pourquoi nous introduisons ici cette notion. L'empéripolèse est un processus biologique peu commun au cours duquel une cellule pénètre le cytoplasme d'une cellule hôte sans subir de dommages, avant d'en ressortir intact. L'observation d'aspirats frais de moelle osseuse a permis de mettre en évidence la présence de lymphocytes se déplaçant dans le cytoplasme des MKs. C'est dans cette étude que le chercheur J.G. Humble introduit le terme empéripolèse à partir du grec, *em* à l'intérieur, *peri* autour et *polemai* se promener⁷⁹. En effet, à la différence de la phagocytose, la cellule en empéripolèse reste viable, intacte et circule au travers du cytoplasme de la cellule hôte. A

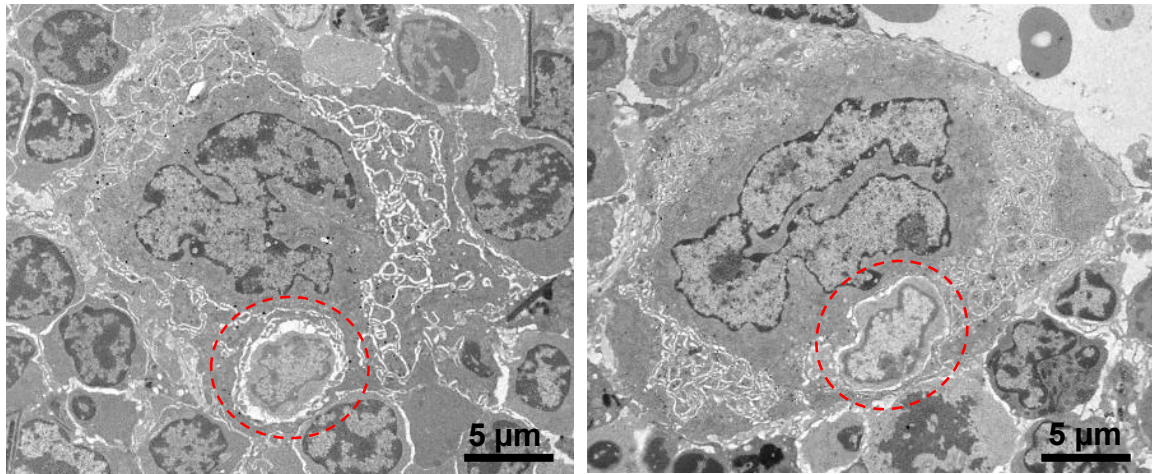


Figure 11: L'empéripolèse est la présence de neutrophiles dans les membranes internes du cytoplasme de certains mégacaryocytes.

On peut observer la présence de neutrophiles (pointillés rouges) dans le compartiment externe des membranes du DMS de certains mégacaryocytes. D'après l'UMR_S1255, Eckly A.

noter que certaines cellules cancéreuses peuvent également faire de l'empéripolèse avec des lymphocytes *natural killer*⁸⁰.

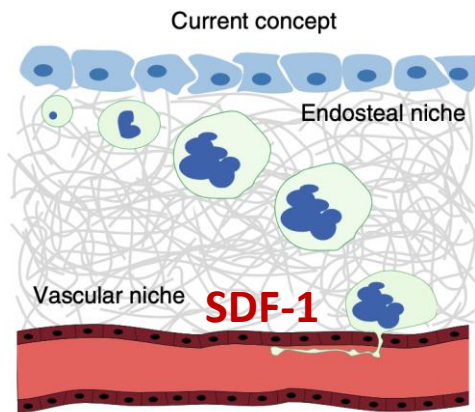
L'empéripolèse est un évènement rare dans les MKs en conditions physiologiques (~ 4% MKs totaux), les cellules invasives étant le plus souvent des neutrophiles (Figure 11). Néanmoins, une augmentation de l'empéripolèse peut être révélatrice de certaines conditions pathologiques ou de stress. C'est notamment le cas dans des syndromes myéloprolifératifs, de myélofibrose idiopathique ou d'inflammation, où la proportion de MKs contenant de nombreuses cellules hématopoïétiques (jusqu'à 5-6 cellules) peut atteindre 34%⁸¹. A ce jour, les mécanismes impliqués dans l'empéripolèse ne sont pas encore clairement établis mais différentes pistes ont été évoquées dans la littérature. L'empéripolèse peut être favorisée par une interaction des neutrophiles avec de la P-sélectine exprimée sur le DMS⁸² ou faire intervenir des molécules d'adhérence telles que les cadhérines⁸⁰. Plus récemment, l'équipe de Nigrovic a montré que l'empéripolèse était un processus médié par le couple ICAM-1 du MK et les intégrines $\beta 2$ du neutrophile⁸³. Cette étude révèle également un transfert des membranes plasmiques des neutrophiles dans le DMS. Les auteurs proposent ainsi que l'empéripolèse soutienne la formation des plaquettes sanguines en modulant la production de la membrane des futures plaquettes. Néanmoins, connaissant la faible proportion de MKs présentant de l'empéripolèse en condition physiologique (4%), on peut se demander la part effective de ce processus dans la thrombopoïèse.

1.2.4. Le franchissement de la barrière sinusoidale

La production des plaquettes exige que le compartiment cytoplasmique du MK mature traverse la barrière des sinusoides. Cette dernière étape de la mégacaryopoïèse peut schématiquement être divisée en quatre séquences d'évènements : l'apposition des MKs au niveau des sinusoides, le contact et passage de la lame basale, le franchissement de la barrière endothéliale et l'énucléation.

L'apposition des MKs aux sinusoides. Les travaux initiaux du groupe de S. Rafii ont fait apparaître le **SDF-1** (*stromal cell-derived factor* ou CXCL12, ligand du récepteur CXCR4) et le **FGF-4** (*fibroblast growth factor*) comme étant les deux principales cytokines impliquées respectivement dans la migration et la maturation des progéniteurs^{42,84-87}. Le SDF-1 se fixe sur le récepteur CXCR4 exprimé sur les progéniteurs et ceci permet leur migration vers les sinusoides par un processus qui requiert, d'une part l'expression de VCAM-1 (CD106) à la

Migration



Absence de migration

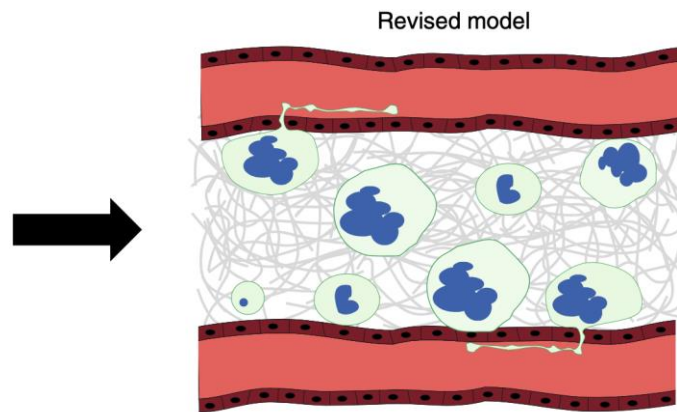


Figure 12 : Le SDF-1 et le positionnement des MKs au niveau des sinusoides.

(A) Modèle tel que décrit par Avecilla et al. en 2004. Le SDF-1 participerait à la migration des mégacaryocytes de la niche endostéale vers les sinusoides, favorisant ainsi la thrombopoïèse. (B) Modèle révisé par Stegner et al., en 2017 suite à la démonstration que les mégacaryocytes sont sessiles et se trouvent à proximité immédiate des sinusoides. Adapté d'après Stegner et al., 2017

surface des cellules endothéliales et, d'autre part, l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (ou VLA-4) sur les MKs^{42,88-90}. Les souris déficientes pour CXCR4 et SDF-1 présentent une altération majeure de la myélopoïèse^{91,92}. La signalisation induite par la liaison de SDF-1 à son récepteur CXCR4 conduit à une augmentation intracellulaire du signal calcique, l'activation des voies de signalisation des kinases (ERK1/2 et Src tyrosine), l'expression de la métalloprotéase MMP-9 et la polarisation des récepteurs CXCR4 à la surface des MKs^{85,87,93-95}. En outre, D. Stegner et coll. ont récemment réalisé des reconstructions 3D de la moelle indiquant que 80 % des **MKs résident directement au niveau des sinusoides**⁹⁶. Cette cartographie met également en lumière la forte densité du réseau sinusoidal de la moelle, avec une distance séparant deux sinusoides d'environ 40 μm . Sachant que le diamètre moyen des MKs de 25 μm , il n'est pas étonnant de voir que la majorité des MKs soient associés à un sinusoides (**Figure 12**). Ces résultats valident ceux de O. Lichtman qui déjà en 1978 montrait une localisation parasinusoidale des MKs⁹⁷. Cette étude confirme également que **les MKs matures ne migrent pas**. *In vivo*, les MKs "bougent" à une vitesse de 0,4 $\mu\text{m}/\text{min}$, à la différence des neutrophiles qui migrent à une vitesse de 20 à 25 $\mu\text{m}/\text{min}$ dans le tissu interstitiel.

Le contact et le passage de la lame basale. Les événements conduisant au passage de la lame basale sont encore très mal compris et impliquent probablement un ensemble d'interactions entre les récepteurs d'adhérence exprimés sur les MKs, notamment les **intégrines** de type $\beta 1$ et $\beta 3$ ainsi que leurs ligands correspondants localisés dans la lame basale des sinusoides. Parmi les intégrines, on peut citer $\alpha 2\beta 1$ qui lie les collagènes dont le collagène IV, $\alpha 5\beta 1$ comme récepteur de la fibronectine, l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ pour les laminines, l'intégrine $\alpha \nu\beta 3$ capable de lier à la fois la fibronectine et la vitronectine et $\alpha \text{IIb}\beta 3$ qui lie le fibrinogène. L'étude des souris « *knock-out* » (KO) pour les sous-unités $\beta 1$ ou $\beta 3$ de la lignée mégacaryocytaire n'a pas révélé de défaut majeur au niveau des MKs ou de la production des plaquettes^{98,99}. La souris déficiente en intégrine $\alpha 2$ dans la lignée mégacaryocytaire présente seulement une faible diminution du volume plaquettaire moyen¹⁰⁰. Par ailleurs, les expériences *in vitro* donnent parfois des résultats contradictoires et ne permettent pas d'établir précisément le rôle des intégrines dans les interactions MKs/protéines extracellulaire. Ceci sera largement discuté dans le chapitre 3 relatif aux intégrines. De façon similaire, on ne sait pas si une activité de dégradation est associée à cette étape, point qui sera détaillé dans le chapitre 4.

Le franchissement de la barrière endothéliale. Cette étape est également supposée faire intervenir des molécules d'adhérences mégacaryocytaires et leurs contre-récepteurs endothéliaux (sélectines, intégrines et molécules d'adhérence cellulaires). Outre l'intervention du couple $\alpha 4\beta 1/VCAM-1$ discuté plus haut⁴², **PECAM-1** (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*) pourrait également contribuer à l'adhérence aux cellules endothéliales. Cette molécule d'adhérence est exprimée à la fois sur les cellules endothéliales et les MKs et permettrait, par interaction homotypique, l'ancrage des MKs aux cellules endothéliales. *In vitro*, le traitement par un anticorps neutralisant anti-PECAM inhibe l'adhérence des MKs aux cellules endothéliales et leur migration en présence de SDF-1. Chez la souris, l'inactivation du gène codant pour PECAM-1 s'accompagne d'une diminution des MKs médullaires associés aux sinusoides^{93,101,102}. De façon intéressante, il a également été proposé récemment que l'endogline (CD105) présente sur les cellules endothéliales, pouvait interagir avec l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ plaquettaire, ce qui interroge sur la possible contribution de ces deux partenaires lors des dernières étapes de la mégacaryopoïèse (communication orale E. Rossi, Club Français des Plaquettes et des Mégacaryocytes, Marseille, 2016).

En 2012, le groupe du S. Massberg a découvert que **la sphingosine 1-phosphate (S1P)** était essentielle dans le guidage des MKs au travers de l'endothélium. La S1P est un phospholipide provenant de la phosphorylation de la sphingosine qui circule en quantité importante dans le sang (sa concentration peut atteindre 1 μM). Elle se lie sur son récepteur S1P1 présent à la surface des MKs. Chez la souris, la délétion du récepteur S1P1 mégacaryocytaire provoque une thrombopénie due à l'accumulation anormale de plaquettes dans le compartiment médullaire extravasculaire¹⁰³. Il est intéressant de noter qu'une anomalie similaire a été identifiée dans la moelle osseuse de souris déficientes pour WASp, impliquant toutefois des mécanismes moléculaires totalement différents. Alors que la morphologie des MKs dans les souris S1P1^{-/-} est normale, les MKs WASp⁻ sont anormaux avec un défaut dans l'organisation du cytosquelette¹⁰⁴ et cela fera l'objet d'une section particulière (Cf. chapitre 4.3.1). Quoiqu'il en soit, l'étude de S. Massberg a été contestée récemment par E. Camerer et collaborateurs démontrant l'absence de défauts dans la mégacaryopoïèse et de la production plaquettaire en utilisant divers outils pharmacologiques et modèles de souris déficientes pour les récepteurs S1P1 et S1P2 ou pour les enzymes de phosphorylation de la sphingosine¹⁰⁵.

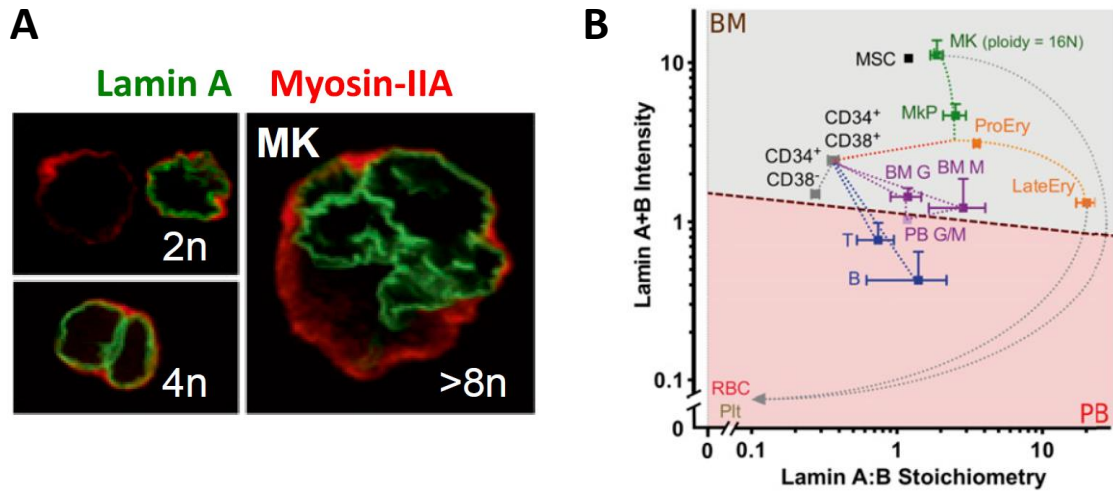


Figure 13 : L'expression des lamines nucléaires lors de la maturation des MKs.

(A) Expérience d'immunofluorescence montrant la présence de lamine A sur la membrane nucléaire d'un MK mature comportant un noyau polylobé (>8n). (B) Au cours de la maturation des MKs, l'expression des lamines A et B augmente avec la ploïdie. MKP:MK progenitors ; EryP: erythroid progenitors ; LateEry: late erythroblasts ; RBC, red blood cells ; G: granulocytes ; M: monocytes ; BM: bone marrow ; PB: peripheral blood. D'après Shin et al., 2013

L'énucléation et le corps résiduel. A la fin du franchissement de la barrière sinusoidale, le corps résiduel du MK constitué d'un **noyau entouré d'une fine enveloppe de cytoplasme et d'une membrane plasmique reste dans la moelle** où il sera phagocyté par les macrophages¹⁰⁶. En raison de la difficulté de capturer cette étape particulière de la mégacaryopoïèse, les mécanismes moléculaires impliqués dans la séparation du noyau et de la masse cytoplasmique du MK ne sont pas connus. L'observation en ME montre un noyau contenant de la chromatine condensée. Ces changements morphologiques sont à rapprocher de ceux que l'on observe au cours de l'apoptose. Les études du groupe de W. Vainchencker ont montré que les MKs sénescents exposent à leurs surfaces de la phosphatidylsérine qui constitue un signal induisant leur phagocytose par les macrophages. Par ailleurs, on sait que l'activation des caspases, en particulier des caspases 3 et 9, est importante dans la formation des plaquettes. L'activation de la caspase 3 est particulière car elle apparaît compartimentalisée dans le cytoplasme du MK¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Pourquoi le noyau des MKs ne franchit-il pas la barrière sinusoidale ? Pour répondre à cette question, il est nécessaire d'introduire **les lamines** qui forment les structures majeures de l'enveloppe nucléaire¹¹⁰. La lamina est un réseau maillé de filaments intermédiaires composé des lamines de type A et B. Les lamines de type A, incluant la lamine C issue d'un épissage alternatif, sont responsables de la rigidité du noyau alors que les lamines de type B jouent un rôle dans son intégrité¹¹¹. D. Discher et collaborateur nous apprennent que le rapport stœchiométrique de l'expression de lamine A/C par rapport à la lamine B, analysé par spectrométrie de masse, est plus grand pour des cellules possédant un noyau rigide¹¹². Par exemple, ce sont les cellules CD34+ qui possèdent le plus faible rapport (~ 0.25) et les érythroblastes le plus élevé (> 10). Les MKs, quant à eux, ont un rapport intermédiaire (~ 1) associé à une forte augmentation de l'expression (~ 10 fois) des lamines au cours de leur maturation. Les auteurs proposent que c'est la taille élevée et la forme complexe de leur noyau polyploïde, plutôt que la rigidité elle-même, qui limite leur passage au travers les sinusoides¹¹³ ([Figure 13](#)). Il est intéressant de souligner ici que les enfants atteints du syndrome de progeria Hutchinson-Gilford (maladie rarissime due à une mutation du gène codant pour la lamine A) présentent un vieillissement prématuré associé à une numération plaquettaire élevée (452.000 à 714.000/ μ l)¹¹⁴. A noter également les travaux de Friedl qui indiquent que le déplacement des cellules à travers une matrice extracellulaire 3D est fonction

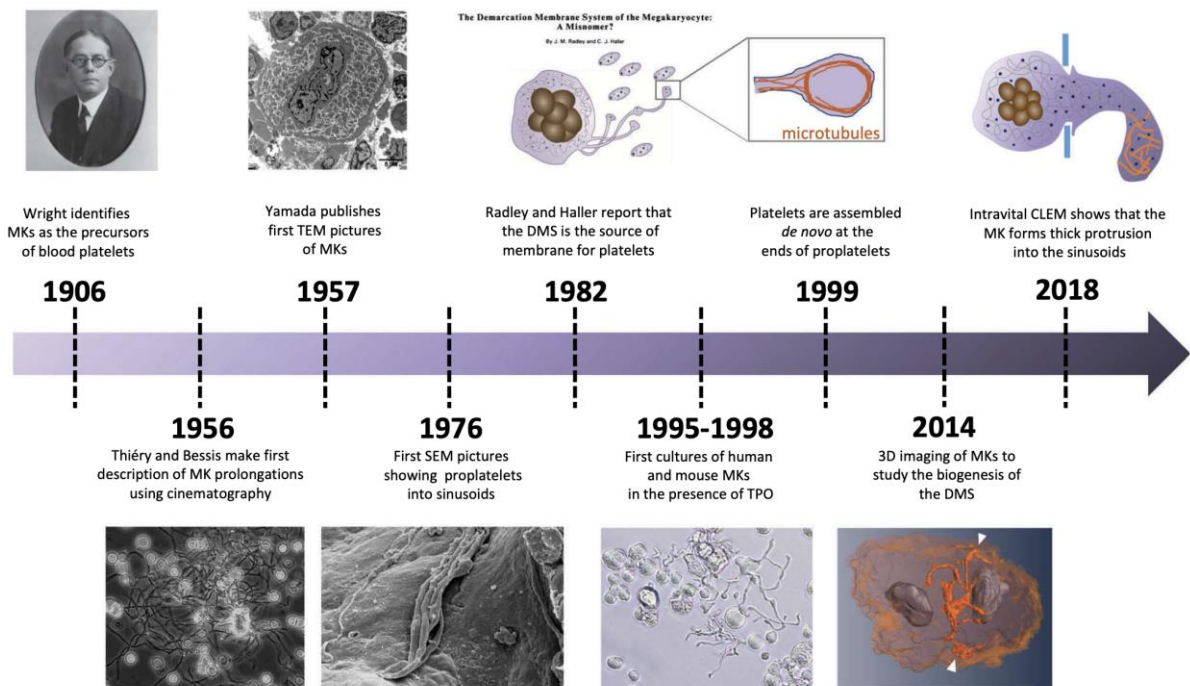


Figure 14 : Historique de la biologie des mégacaryocytes et des plaquettes.
 D'après Scandola et al., 2020.

de 2 paramètres : **la porosité de la matrice et la déformabilité du noyau**, la déformabilité du noyau étant atteinte à 10 % de la section nucléaire¹¹⁵.

En résumé de cette section 1.2.4, on peut souligner **le caractère singulier et unique du processus de transmigration des MKs**. Contrairement aux autres cellules hématopoïétiques, les MKs matures résident à proximité immédiate des sinusoides et ne migrent pas dans le tissu hématopoïétique, leur passage transendothélial nécessite une déformation cellulaire extensive afin de faire passer l'énorme masse cytoplasmique à travers les ouvertures étroites de la barrière sinusoidale et, ce processus s'accompagne de la séparation du noyau polylobé de la masse cytoplasmique de la MK, un événement totalement incompris à l'heure actuelle.

1.3. L'étape finale : La production des plaquettes

1.3.1. La thrombopoïèse : les études *in vitro* et *in vivo*

L'histoire des proplaquettes. Dès 1956, Thiéry et Bessis ont observé, à partir d'explants frais de moelle osseuse de rats, que les MKs étendaient *ex vivo* de longues extensions filiformes, leur conférant une morphologie de pieuvre¹¹⁶ (Figure 14). Des études de microscopie électronique à balayage confirmeront ensuite *in situ* que les MKs émettent des pseudopodes de tailles variables dans la lumière des sinusoides médullaires. Ces images sont à l'origine de l'appellation « **proplaquettes** »^{117,118}. En 1994, la découverte de la TPO a facilité la compréhension des mécanismes de formation des plaquettes en rendant possible les études *in vitro*^{59,119,120}. Ces études ont ainsi permis de décrypter le rôle essentiel des microtubules dans ce processus qui, en glissant les uns sur les autres (« *sliding* »), permettent l'élongation des proplaquettes^{59,77,121,122} et le trafic d'organites vers les extensions proplaquettaires¹²³. En 1999, l'équipe de Hartwig *et al.*, a montré que les microtubules s'enroulent au bout des proplaquettes, postulant que les plaquettes sont produites à partir de ces boutons plaquettaires¹²¹. Ceci a conduit à ce que le "**modèle des proplaquettes**" tel qu'identifié *in vitro* devienne le modèle prédominant pour exprimer la libération des plaquettes par le MK. Pourtant, une limite à la description de ce modèle est le caractère artificiel des systèmes de culture qui pourrait biaiser les résultats. On sait par exemple que la maturation des MKs est beaucoup moins efficace dans les conditions de culture, avec une ploïdie plus faible, un DMS sous-développé et l'absence de la zone périphérique (Figure 10A). Ceci pourrait également

Protéine	Modèle d'étude	Espèce	Compte et volume plaquettaire	Information complémentaire	Références
α -actinine1	Mutation de <i>ACTN1</i>	Homme	Macrothrombopénie	Augmentation du diamètre des proplaquettes <i>in vitro</i>	Guégen et al., 2013; Kunishima et al., 2013; Bottega et al., 2015
ADF/cofiline	KO <i>Adf/n-cofilin</i> lignée MK spécifique	Souris	Macrothrombopénie	Augmentation du nombre de MKs accolés au sinusoiide, défaut d'organisation du DMS, de la PZ, des granules	Bender et al., 2010
Cortactin	KO <i>Cttn</i> lignée MK spécifique	Souris	RAS		Thomas et al., 2017; Messaoudi et al., 2017
Filamine-A	Patients avec filaminopathies A	Homme	Macrothrombopénie	Maturation anormale des MKs <i>in vitro</i>	Nurden et al., 2011
	KO <i>Fln2</i>	Souris	Macrothrombopénie	Libération de plaquettes prématures, fragiles, à clairance rapide	Jurak Begonja et al., 2011
mDia1	KO <i>mDia1</i>	Souris	RAS		Thomas et al., 2011
Myosine IIA	Patients avec syndrome MYH9	Homme	Macrothrombopénie	Maturation anormale des MKs <i>in vitro</i> , libération accrue de proplaquettes	Chen et al., 2013
	KO <i>MYH9</i> lignée MK spécifique	Souris	Macrothrombopénie	Nombre de MKs augmenté, défaut de maturation des MKs, réduction des territoires cytoplasmiques	Léon et al., 2007; Eckly et al., 2009; Pertuy et al., 2014
Myosine IIB	shRNA MYH10 sur cellules CD34+	Homme	NA	Augmentation de la ploïdie des MKs, défaut de régulation de l'endomitose	Lordier et al., 2012
Pacsin-2	Mutation dirigée PACSIN2F	Homme Souris	NA		Jurak Begonja et al., 2015
Profiline	KO <i>Pfn1</i> lignée MK spécifique	Souris	Microthrombopénie	Demi-vie plaquettaire réduite, Libération de plaquettes en intramédullaire	Bender et al., 2014
Tropomoduline 3	KO <i>Tmod3</i>	Souris	Macrothrombopénie	Défaut d'organisation du DMS, de la PZ, des organelles, défaut d'organisation des podosomes <i>in vitro</i>	Sui et al., 2015
WASp	Patients avec Syndrome de Wiskott-Aldrich	Homme	Microthrombopénie	Clairance augmentée	Moulding et al., 2013
	KO <i>WASp</i>	Souris	Microthrombopénie	Proplaquettes intramédullaire, DMS anormal, défaut de formation des podosomes <i>in vitro</i>	Sabri et al., 2006; Schachtner et al., 2013
Arp2/3	KO <i>Arpc2</i> lignée MK spécifique	Souris	Microthrombopénie	Proplaquettes intramédullaire, DMS anormal, défaut de formation des podosomes <i>in vitro</i>	Paul et al., 2017
Twinfilin1/ Cofilin 1	KO <i>Twf1/Cof</i> lignée MK spécifique	Souris	Macrothrombopénie	Crosstalk actin/microtubule Défaut formation proplaquettes, Nombre de MKs augmenté	Becker et al., 2020

Tableau 1 : Les protéines régulatrices du cytosquelette d'actine et la mégacaryopoïèse.

expliquer la différence d'architecture entre les proplaquettes produites dans la moelle osseuse ou en culture (Figure 10B).

Grâce au développement de la technique de microscopie intravital bi-photonique sur le crâne de souris, Junt *et al.*, ont pu filmer le passage en temps réel de fragments cytoplasmiques mégacaryocytaires dans la circulation sanguine¹²⁴. Les auteurs observent ainsi que ce sont des extensions cytoplasmiques volumineuses (~ 800 fois le volume moyen d'une plaquette) qui entrent dans la circulation, et formeront ensuite des proplaquettes en s'étirant dans la circulation vasculaire. **Le passage transendothélial de MKs entiers dans la circulation est rarement observé** lors de ces acquisitions d'images en intravital. Ces résultats sont en accord avec ceux de A. Poole qui, en utilisant une approche corrélative associant la microscopie intravital et la MET, a démontré la présence de grosses extensions mégacaryocytaires traversant l'endothélium¹²⁵. La force du flux sanguin et le remodelage du cytosquelette contrôlent ensuite la libération des plaquettes par fragmentation des proplaquettes.

Le rôle du cytosquelette dans la thrombopoïèse/plaquetto-genèse. La formation des proplaquettes nécessite des remaniements importants du cytosquelette. L'assemblage des **microtubules procure la force pour l'extension des proplaquettes**^{123,126}. Ceci a été visualisé en temps réel par microscopie à fluorescence grâce à l'utilisation de MKs exprimant la protéine de fusion EB3-GFP (end-binding protein 3 s'associant à l'extrémité (+) des microtubules). Ces études ont également mis en lumière le rôle essentiel de la dynéine, une protéine motrice se fixant sur les extrémités (-) des microtubules. A l'extrémité de la proplaquette, les microtubules forment une boucle qui délimiterait la future plaquette^{122,123,126}. Par ailleurs, l'utilisation de souris déficientes en tubuline $\beta 1$, l'isoforme principale exprimée dans les MKs, montre l'importance des microtubules avec l'apparition d'une population de plaquettes circulantes apparaissant sphériques¹²⁷. Il est important de souligner que ce rôle des microtubules dans la formation des proplaquettes repose essentiellement sur des observations *in vitro*. Dans notre laboratoire, C. Léon et collaborateurs ont montré que le rôle des microtubules semble être moins important *in vivo* où les forces hémodynamiques semblent être suffisamment fortes pour contribuer substantiellement à l'élongation des proplaquettes¹²⁸. En conséquence, l'inactivation ou la mutation des tubulines entraînent une absence quasi totale des proplaquette *in vitro*, alors que *in vivo* on n'observe qu'une diminution de ~50 % des proplaquettes et des plaquettes circulantes *in vivo*^{16,128}

Protéine	Modèle d'étude	Espèce	Compte et volume plaquettaire	Information complémentaire	Références
Cdc42	KO <i>cdc42</i> lignée MK spécifique	Souris	Macrothrombopénie	Clairance augmentée, défaut de formation des podosomes <i>in vitro</i>	Pleines et al., 2010; Heib et al., 2021
Rac1	KO <i>Rac1</i> inducible	Souris	RAS		Akbar et al., 2007; Akbar et al., 2010
Cdc42 + Rac1	KO <i>Rac1/Cdc42</i>	Souris	Macrothrombopénie	Nombre de MKs augmenté, désorganisation des microtubules, libération de fragments en intramédullaire	Pleines et al., 2013
RhoA	KO <i>RhoA</i> lignée MK spécifique	Souris	Macrothrombopénie	Nombre de MKs augmenté, ploïdie augmentée, MKs intravasculaires	Pleines et al., 2012; Suzuki et al., 2013; Heib et al., 2021
RhoA/Cdc42	KO <i>RhoA/cdc42</i> lignée MK spécifique	Souris	Macrothrombopénie	Défaut d'organisation du DMS, absence de territoires cytoplasmiques, réduction du nombre de proplaquettes <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> , défaut de formation des podosomes <i>in vitro</i>	Heib et al., 2021

Tableau 2 : Les GTPases et la mégacaryopoïèse.

Dans notre unité de recherche, F. Lanza et collaborateurs ont également identifié d'autres isoformes essentielles dans la formation des plaquettes telles que la tubuline $\alpha 4A$ dont la mutation non-sens V260E conduit à une macrothrombopénie et une sphéricité associée à une réduction du nombre d'enroulements de microtubules dans la bande marginale¹⁶. Par ailleurs, des études récentes proposent que les modifications post-traductionnelles jouent également un rôle dans la formation des plaquettes. Ceci découle de l'observation qu'un inhibiteur de l'histone désacétylase 6 (abrégée HDAC6), le Panobinostat, induit une thrombopénie chez l'homme et conduit à une mégacaryopoïèse anormale avec une altération de la formation des proplaquettes *in vitro*^{129,130}. Depuis il a été démontré que ces effets, dont on pensait initialement qu'ils résultaient de l'hyperacétylation des microtubules, étaient plutôt provoqués par l'hyperacétylation de la cortactine, une autre cible des HDAC6¹³¹. Il est également intéressant de noter que l'axe HDAC6-cortactine n'est requis pour la biogénèse des plaquettes que chez l'homme, mais pas chez la souris.

Le rôle précis du cytosquelette d'actine reste encore aujourd'hui moins bien compris. Il est néanmoins admis que **l'acto-myosine joue un rôle clé dans les étapes de structuration et la polarisation du DMS^{52,132}, ainsi que sur la ramification des proplaquettes¹³³**. Les analyses de mutations humaines et murines ont rapporté différents acteurs importants dans l'organisation et la dynamique de l'actine reliée à la plaquetogénèse. Parmi ceux-là, on peut citer la myosine IIA^{15,76,134-136}, la cofiline¹³⁷, la filamine A^{138,139}, WASp^{104,140,141}, la formine mDia1¹⁴², l' α -actinine 1¹⁴³⁻¹⁴⁵, la tropomoduline 3¹⁴⁶ et la Pacsin 2⁷² (**Tableau 1**). En général, ces protéines sont impliquées soit dans 1) l'endomitose, 2) l'adhérence avec la matrice, via les podosomes, 3) l'organisation du DMS ou 4) la distribution des organelles.

De façon complémentaire, parmi les différentes molécules de signalisation capables de moduler la dynamique du cytosquelette d'actine et des microtubules, les **GTPases de la famille Rho** occupent une place essentielle. De nombreuses études¹⁴⁷⁻¹⁵³ s'accordent pour démontrer leurs contributions dans la production des plaquettes. Le but n'est pas d'en détailler les mécanismes ici mais simplement d'en présenter un résumé dans un tableau retraçant leurs effets principaux sur la mégacaryopoïèse et thrombopoïèse (**Tableau 2**).

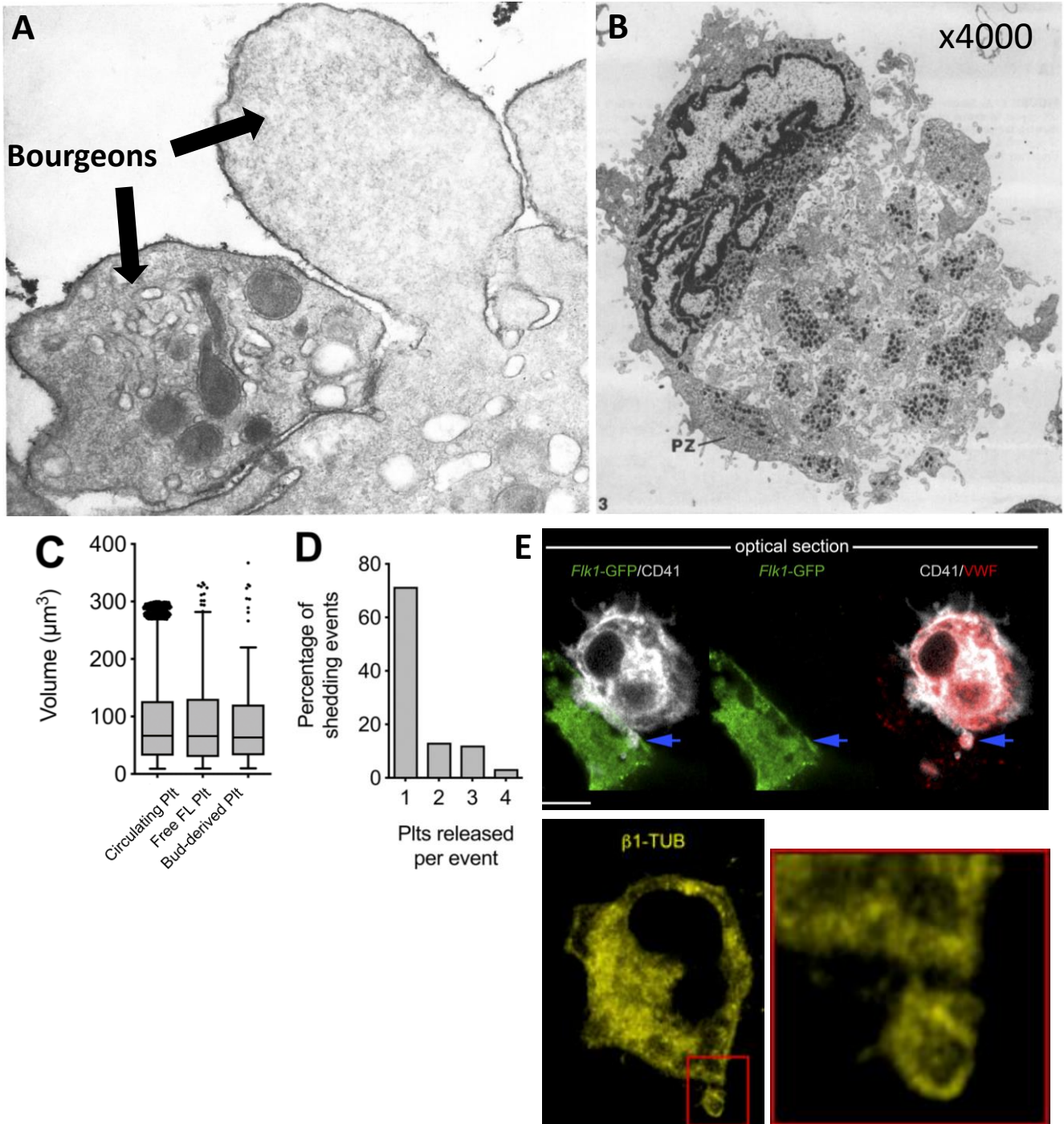


Figure 15 : Le bourgeonnement membranaire des mégacaryocytes et la formation des plaquettes.

(A) Image de microscopie électronique à transmission montrant deux bourgeons dont l'un est vide et l'autre contient des organites mais pas de microtubules, x38000. Adapté, d'après Zucker-Franklin, 1988. (B) Image de microscopie électronique à transmission montrant un mégacaryocyte en cours de fragmentation, x4000. D'après Zucker-Franklin, 1984. (C)(D) Les bourgeons décrits par Potts et al. correspondraient à des plaquettes sanguines de par leur volume similaire, libérant ainsi une plaquette par bourgeons. (E) Image d'une coupe de foie fœtal montrant un mégacaryocyte (CD41, en blanc) libérant un bourgeon au travers de l'endothélium (Flk1-GFP, en vert). Ce bourgeon serait directement une plaquette de par son contenu granulaire en facteur von Willebrand (en rouge). La tubuline serait également présente dans le bourgeon (en jaune). Adapté, d'après Potts et al., 2020.

1.3.2. Le bourgeonnement membranaire des mégacaryocytes : une alternative à la production plaquettaire ?

Les plaquettes pourraient-elle se former différemment ? Dans une étude publiée par Potts *et al.* l'année dernière dans *J. Exp. Med.*, les auteurs s'interrogent sur la rareté des proplaquettes observées par microscopie intravitale. Leurs observations stipulent que seulement 2% des MKs forment des proplaquettes *in vivo*, les conduisant à se demander s'il n'existerait pas une autre alternative, plus « rentable », à la production de plaquettes¹⁵⁴. En utilisant des approches d'imageries super-résolutives, ils rapportent ainsi la présence de **bourgeons membranaires** à la surface des MKs dont la taille, l'aspect et le contenu pourrait correspondre à des plaquettes circulantes. Il est à noter que cette observation n'est pas nouvelle. En effet, d'anciennes études de ME rapportées par Zucker-Franklin décrivaient déjà des bourgeons similaires¹⁵⁵ (Figure 15A-B), mais l'idée qu'ils puissent être une source de plaquettes avait été abandonné sur la base des arguments suivants : 1) les futures plaquettes se détachant des MKs ne sont pas délimitées par une bande marginale d'enroulements de microtubules¹⁵⁶ et 2) l'aspect des MKs laissait à penser que les cellules étaient en cours d'apoptose¹⁵⁷. Dans l'étude de Potts *et al.*, des expériences d'immunomarquage ciblant la forme active de la caspase 3 suggèrent que la formation des bourgeons n'est pas un phénomène apoptotique. Par ailleurs, ils mettent à profit des souris *Pf4-Cre:Confetti*, dont les MKs expriment alternativement YFP (*Yellow fluorescent protein*) ou RFP (*Red fluorescent protein*) au cours de leur maturation, afin d'établir que les bourgeons membranaires sont bien en continuité avec les MKs. Grâce à la microscopie intravitale, ils visualisent le détachement des bourgeons plaquettaires dans la circulation sanguine (Figure 15C-E).

Evaluation critique de cette étude. De mon point de vue, cette étude soulève un certain nombre de questions concernant notamment la visualisation des évènements (images dont la résolution n'est pas toujours suffisante), les mécanismes moléculaires conduisant à la formation des bourgeons (non étudiés) et l'efficacité de ce processus (1 bourgeon libère seulement une plaquette tandis qu'une proplaquette libère une centaine de plaquettes). Par ailleurs, ce type de bourgeonnement est fréquemment détecté lors d'une mégacaryopoïèse de stress ou anormale. Il serait donc possible que les évènements décrits par Potts dépendent de l'état des MKs. Ceci n'est pas sans rappeler les travaux de Nishimura et collaborateurs qui proposent que les plaquettes puissent être libérées directement par une rupture directe de la

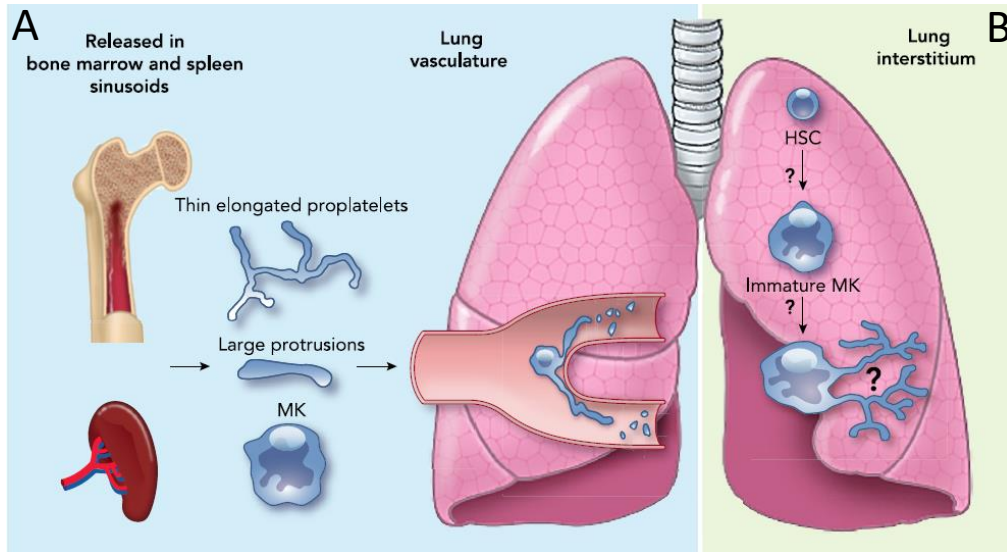


Figure 16 : Rôle du poumon dans la biogenèse des plaquettes.

(A) La production de plaquettes dans la microcirculation pulmonaire : Suite à la libération de fragments cytoplasmiques par le mégacaryocyte au travers des sinusoides de la moelle osseuse, les proplaquettes se remodelent dans la circulation sanguine et notamment dans la microcirculation pulmonaire où elles se fragmentent en plaquettes. Cette microcirculation permettrait le remodelage des rares mégacaryocytes entiers ayant traversé la barrière sinusoidale. (B) Le poumon serait également un réservoir de mégacaryocytes et de progéniteurs pouvant migrer et compenser des déficits cellulaires et plaquettaires au sein de la moelle osseuse. D'après Lefrançais et al., 2017.

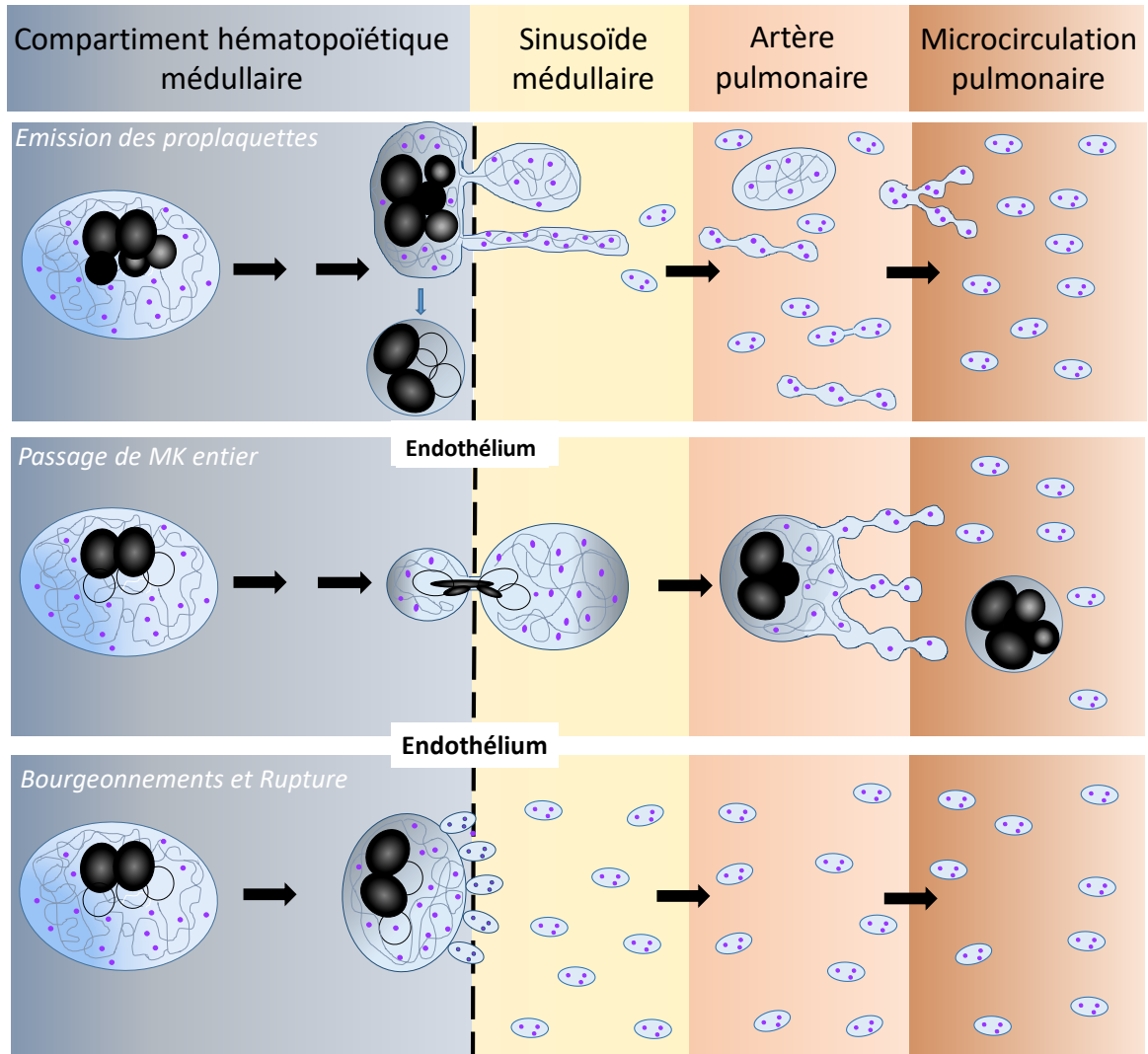
membrane plasmique des MKs (les auteurs parlent « d'explosion du MK »). Ceci se produit dans un contexte inflammatoire, lorsque les niveaux circulants d'interleukine IL-1 α sont élevés dans la souris¹⁵⁸. Cette cytokine est libérée par les cellules non hématopoïétiques, telles que les cellules endothéliales, lorsqu'elles sont endommagées. Dans ces conditions inflammatoires les MKs présentent une activation de la caspase-3 indiquant un état pro-apoptotique, faisant écho avec les observations de fragmentation mégacaryocytaire des années 1980s.

1.3.3. Le rôle du poumon dans la biogénèse des plaquettes

La microcirculation pulmonaire : un filtre pour les mégacaryocytes. En 1937, Howell et Donahue observent l'existence de deux populations de MKs : l'une dans la moelle osseuse et l'autre dans les poumons. Ils proposent alors que des plaquettes puissent être produites par fragmentation des MKs dans la circulation sanguine^{40,159}. La contribution du poumon en tant qu'organe thrombopoïétique est cependant longtemps restée débattue par manque de preuves directes. Ce qui fait tout l'intérêt du travail de E. Lefrançais *et al.*, c'est l'observation en dynamique de MKs et de larges fragments cytoplasmiques piégés dans la circulation pulmonaire, libérant chacun entre 500 à 1 000 plaquettes sur une durée de 60 min¹⁶⁰. Grâce à une technique innovante d'imagerie intravitale, ils observent des MKs qui quittent la moelle osseuse et entrent dans la circulation sanguine, confirmant ainsi le modèle selon lequel de larges fragments cytoplasmiques sortent de la moelle osseuse¹²⁴ et circulent jusqu'aux poumons où ils sont alors retenus et étendent des proplaquettes. Les contraintes physiques liées aux étroits vaisseaux pulmonaires, premier lit vasculaire rencontré par les MKs, favorisent la libération des plaquettes ([Figure 16A](#)).

Le poumon : un réservoir de progéniteurs sanguins ? L'une des observations les plus curieuses de ce travail de 2017 concerne la présence d'une deuxième population de MKs, plus immatures, qui résident dans le compartiment extravasculaire du poumon. Afin de déterminer la provenance et le rôle de ces cellules, les auteurs ont transplanté des poumons perfusés sains de souris PF4-tomato, dont les MKs sont verts, dans des souris thrombopéniques. Ils montrent ainsi que les CSH présents dans le poumon, provenant des animaux sains, sont capables de migrer vers la moelle osseuse des animaux thrombopéniques où elles reconstituent un nombre de plaquettes normales ([Figure 16B](#)). Bien que cette étude indique l'existence de progéniteurs hématopoïétiques au sein du poumon, elle n'en reste pas moins

In vivo



In vitro

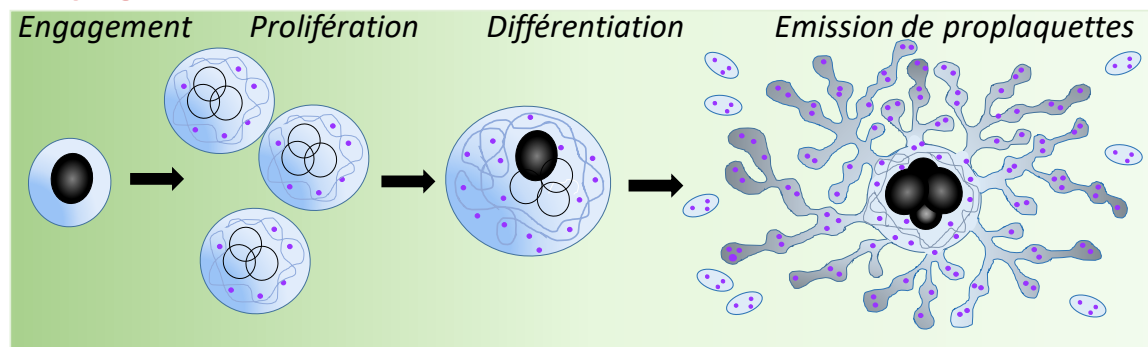


Figure 17 : Différents modèles sont proposés pour expliquer la formation des plaquettes à partir des mégacaryocytes.

D'après Anita Eckly, UMR_S1255

étonnante puisque des systèmes de transplants pulmonaires chez l'homme ont démontré l'origine extra-pulmonaire des MKs¹⁶¹. Il subsiste également quelques incertitudes concernant les travaux de E. Lefrançais *et al.*, notamment 1) l'impact de l'inflammation induite par la transplantation pulmonaire qui pourrait faciliter la sortie de progéniteurs et/ou MKs médullaires¹⁵⁸, 2) la possibilité qu'il subsiste des CSHs dans les poumons perfusés des souris donneuses de greffe, et 3) l'identité de cette deuxième population PF4-GFP positive, sachant qu'une « fuite d'expression » de la PF4 vers d'autres lignées hématopoïétiques (en particulier les leucocytes circulants, les macrophages infiltrant les tissus et les cellules immunitaires en conditions inflammatoires) a été rapporté par notre laboratoire¹⁶².

En conclusion de cette partie relative à la thrombopoïèse, de nombreuses interrogations persistent concernant cette étape. Quels sont les mécanismes qui régulent la libération des plaquettes au bon endroit ? Quel sont les signaux déclenchant l'émission des fragments cytoplasmiques ? Par ailleurs, on ne peut pas exclure que, selon le contexte physiopathologique, plusieurs modèles de thrombopoïèse puissent co-exister dans la moelle osseuse^{158,163}. La [figure 17](#) récapitule les différents modèles rapportés jusqu'ici dans la littérature pour décrire la biogénèse des plaquettes sanguines.

Le MK est une cellule unique et fascinante, très différente des autres cellules hématopoïétiques, de par ses mécanismes de différenciation (endomitose, DMS) et de son passage au travers des sinusoides. Après avoir établi la place centrale du MK dans la production des plaquettes sanguines, nous allons maintenant nous intéresser à ses interactions avec son microenvironnement qui constituent un élément essentiel dans la biogénèse des plaquettes.

Le microenvironnement de la moelle osseuse

2

Sommaire

2.1. La matrice extracellulaire	21
2.1.1. Les composants-clefs de la matrice extracellulaire (MEC).....	22
2.1.2. La matrice interstitielle.....	24
2.1.3. La lame basale.....	26
2.2 La composante cellulaire du microenvironnement.....	27
2.2.1. Les cellules endothéliales des sinusoides médullaires.....	27
2.2.2. Autres composants cellulaires associés aux sinusoides.	29

Dans la moelle, les cellules interagissent en permanence entre elles et avec le stroma environnant. Ces interactions sont de natures multiples et impliquent des facteurs solubles, matriciels, cellulaires et biomécaniques¹⁶⁴. De ce fait, une bonne connaissance globale du microenvironnement proche du MK, de son architecture et des interactions réalisées au cours du développement du MK est essentielle.

2.1. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) forme un réseau enchevêtré de macromolécules diverses. Son rôle principal de charpente permet le maintien de l'architecture tissulaire et fournit les propriétés structurales (porosité, solubilité, topographie) et mécaniques (rigidité) nécessaires pour la fonctionnalité du tissu. La MEC sert également de réservoir de molécules biologiquement actives et son contact direct avec les cellules en fait un régulateur important des comportements cellulaires. Ainsi, les MKs étant enchassés dans la MEC, il est nécessaire de prendre en compte ces éléments environnementaux pour mieux comprendre le mode de fonctionnement des MKs.

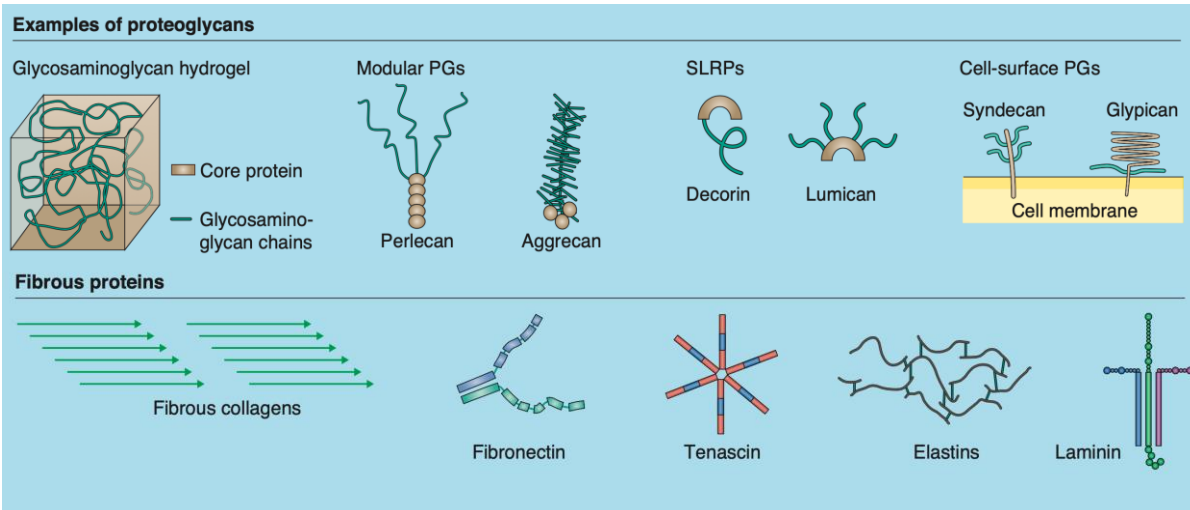


Figure 18 : Les principales molécules de la matrice extracellulaire.

La matrice extracellulaire est un réseau de protéines dont le perlécan (un glycoaminoglycan à sulfate d'héparane), du collagène, de fibronectine, de lamines.
 D'après Frantz et al., 2010.

2.1.1. Les composants-clefs de la matrice extracellulaire (MEC)

La MEC est constituée des macromolécules formant un gel hydraté (protéoglycanes, acide hyaluronique), des protéines structurales (laminines, fibronectines, collagène de type IV, etc) et des facteurs solubles (cytokines, chimiokines, enzymes sécrétées, etc)¹⁶⁵ (Figure 18).

Les protéoglycanes. Ce sont les composants les plus abondants de la MEC. Ils sont constitués d'un cœur protéique sur laquelle sont greffées de longues chaînes de disaccharides non branchées, dénommées glycosaminoglycanes (GAG). Les protéoglycanes à héparanes sulfates regroupent des récepteurs transmembrannaires tel que les syndécanes et des composants sécrétés parmi lesquels on trouve le perlécan¹⁶⁶. Grâce à ses différents domaines d'interaction, le cœur protéique des protéoglycanes interagit avec les autres composants de la matrice et participe à la formation du réseau enchevêtré qu'est la MEC. Ils ont la capacité de lier et séquestrer des médiateurs solubles, constituant ainsi un réservoir de molécules bioactives qui contrôle leur activité et leur biodisponibilité¹⁶⁷. Les GAGs sont impliqués dans la mobilisation des CSHs¹⁶⁸. Dans notre laboratoire, les travaux menés par le groupe de Y. Senis ont permis de montrer que le perlécan était un ligand des récepteurs G6b-B. Ce récepteur de la famille des immunorécepteurs à motif inhibiteur à base de tyrosine (ITIM) est spécifique à la lignée mégacaryocytaire. Il est impliqué dans une voie de signalisation basée sur les tyrosines phosphatases Shp1/Shp2 qu'il lie via leur domaine SH2 (Src homology 2 domain). Les souris déficientes en G6b-B ont un phénotype complexe associant macrothrombopénie, myélofibrose et défauts fonctionnels des plaquettes incluant l'agrégation au collagène. J'ai montré que l'ultrastructure des MKs de ces souris était normale, indiquant que la macrothrombopénie ne résulte pas d'un défaut de maturation des MKs. Cette analyse a fait l'objet d'une figure (Fig. 9) dans le manuscrit publié¹⁶⁹ (Annexe 5).

Les laminines. Ce sont des protéines hétérotrimériques de haut poids moléculaire comportant 15 isoformes composés de 3 chaînes polypeptidiques α , β et γ reliés par des ponts disulfures. Elles interagissent avec de nombreux composants de la matrice (collagène IV, nidogène, perlécan) et forment un maillage polymérique (*mesh-like polymer*) par auto-assemblage. Ceci en fait une composante essentielle à la structuration de la membrane basale¹⁷⁰. Leur localisation préférentielle au niveau basal des cellules endothéliales confère une plus grande rigidité à cette face¹⁷¹. Des études réalisées dans le laboratoire ont montré que ce sont les laminines de type $\alpha4$ et $\alpha5$ qui sont majoritairement exprimées autour des

vaisseaux sanguins¹⁷². Les principaux récepteurs des laminines sont les intégrines $\beta 1$ et $\beta 4$, les dystroglycanes et les héparanes sulfates¹⁷³. Au niveau de la lignée mégacaryocytaire/plaquette, l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ est le principal récepteur aux laminines¹⁷².

La fibronectine. Cette protéine est produite par de très nombreux types cellulaires et régule des activités cellulaires importantes telles que l'adhérence, la migration, la prolifération et la différenciation¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. La fibronectine est abondamment présente sous forme soluble dans le plasma et peut être incorporée dans la paroi des vaisseaux. Elle peut également être sécrétée sous forme cellulaire insoluble par les cellules stromales¹⁷⁷. La fibronectine est alors organisée en fibrilles par un processus appelé fibrillogenèse. Ces changements de conformations de la fibronectine conduisent à l'exposition de sites cryptiques de liaisons aux intégrines¹⁷⁸. C'est sous cette forme, insoluble et fibrillaire, qu'elle est présente dans la MEC. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est le récepteur principal liant la fibronectine puisque le traitement au EMF-10, un antagoniste spécifique de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, ou au SAM-1, un anticorps bloquant spécifique, annulent la liaison des MKs à la fibronectine¹⁷⁹. Parmi les sites d'interactions entre la fibronectine et les intégrines, on peut citer le motif RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique) présent dans le domaine de liaison aux cellules mais également les domaines EDA (*extra domain A*) et EDB (*extra domain B*)¹⁸⁰.

Le collagène de type IV est un élément essentiel et spécifique de la lame basale qui lui confère sa stabilité¹⁸¹. Il existe différents types de collagène et le collagène IV fait partie des collagènes non-fibrillaires. Il arbore une structure hélicoïdale et forme un réseau linéaire soutenant les sinusoides. On peut ici souligner que le *collagène fibrillaire de type I* est, quant à lui, localisé au niveau de l'os et, par conséquent distant des MK péri-sinusoidaux. Ceci est particulièrement important quand on sait que de nombreuses études *in vitro* utilisent le collagène I pour évaluer la capacité des MKs à adhérer à une matrice extracellulaire, ce qui ne reproduit pas les caractéristiques de la membrane basale observée *in vivo*. C'est notamment le cas pour l'étude des podosomes formés par les MKs (Cf. chapitre 4). En outre, il a été montré que les interactions avec les collagènes I et IV pouvaient conduire à des effets opposés. En effet, *in vitro*, le collagène de type IV favorise leur formation en activant la voie de signalisation PI3kinase/Akt^{182,183}. A l'inverse, lorsque les MKs sont déposés sur une matrice composée de collagène de type I, cela inhibe la formation des proplaquettes via l'activation de la voie de signalisation Rho/ROCK^{180,184}. Il est intéressant de noter que les MKs déficients en WASp perdent cette voie d'inhibition induite par la liaison intégrine $\alpha 2\beta 1$ -collagène I¹⁰⁴.

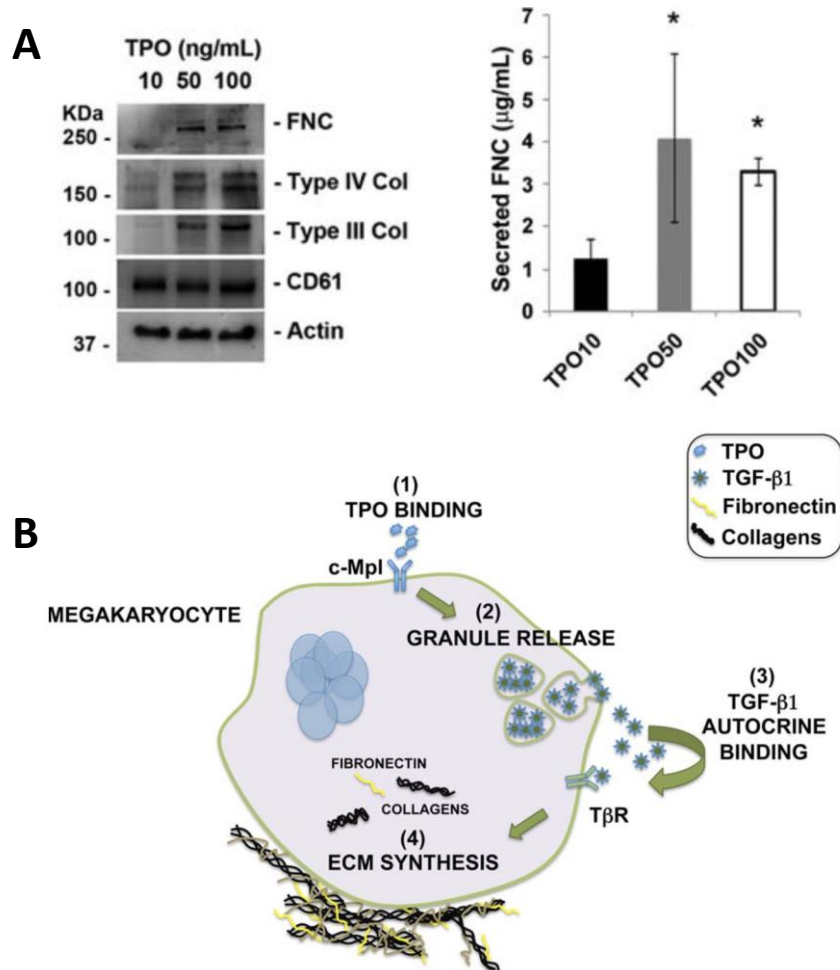


Figure 19 : La synthèse de matrice extracellulaire par les mégacaryocytes.

(A) Western blot montrant l'augmentation de synthèse de MEC par les mégacaryocytes en présence de doses croissantes de rhTPO. Etude *in vitro* montrant la synthèse et sécrétion dose-dépendante de fibronectine suite à une stimulation de mégacaryocytes humains à la rhTPO. (B) Boucle de régulation proposée pour agir sur la synthèse de MEC par les mégacaryocytes par voie autocrine TPO/TGF-β1. D'après Abbonante et al., 2016.

Le fibrinogène et le facteur Willebrand : autres composants de la MEC ? Sur la base d'un immunomarquage sur coupes de moelle osseuse murine, une seule étude évoque la possibilité de la présence de fibrinogène autour des sinusoides¹⁸⁵. En ce qui concerne le facteur Willebrand, nos observations de coupes de moelle osseuse murine indiquent son absence dans la lame basale des sinusoides (observations personnelles), interrogeant également sur la pertinence d'utiliser cette protéine dans les études d'interactions des MKs-matrice extracellulaire¹⁸⁶. D'autres composants de la MEC, tels que la fibrilline-1, la tenascine-C, l'adrine, la thrombospondine et la matrilin-A ont été décrits pour jouer un rôle dans la prolifération des CSHs¹⁶⁴.

Les facteurs bioactifs liés à la matrice. La MEC est un réservoir de facteurs bioactifs. Ces derniers n'ont pas de rôle structural mais ont un rôle fonctionnel puisqu'ils correspondent à des molécules qui stimulent la prolifération ou la différenciation cellulaire. Le SDF-1, ligand du récepteur CXCR4 et le FGF-4, deux principales cytokines impliquées respectivement dans la migration et la maturation des progéniteurs^{42,84-87}, font partie de cette catégorie (Cf. Chapitre 1.2.4).

2.1.2. La matrice interstitielle

Les MKs et la matrice interstitielle sont intimement liés : l'un participant au développement et au maintien de l'autre, et vice versa. La synthèse des protéines de la MEC est assurée par les cellules mésenchymateuses telles que les fibroblastes, les péricytes et les cellules endothéliales, qui sont elles-mêmes influencées par la matrice¹⁸⁷. Ces dernières années, les travaux conduits par A. Baluidini ont permis de montrer que les MKs étaient eux aussi capables de synthétiser et sécréter du collagène IV, des laminines et de la fibronectine, constituant ainsi une « niche autocrine » autour du MK^{180,188}. De plus, il a été observé que la synthèse de la fibronectine et du collagène était régulée par le facteur de croissance TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor-beta1*), synthétisé par le MK^{189,190}. C'est la liaison de la TPO sur son récepteur c-MPL qui induit la sécrétion de TGF- β 1 permettant, à son tour, de stimuler la sécrétion de fibronectine et collagène. Par l'intermédiaire de cette boucle d'auto-régulation TPO/TGF- β 1, le MK peut contrôler lui-même son propre microenvironnement et son développement¹⁹¹ (Figure 19).

Le remodelage de la matrice interstitielle. La MEC est en permanence soumise à un remodelage qui résulte d'une balance étroite entre la synthèse/dépôt des composants matriciels, leur dégradation par les enzymes et leur organisation structurale. Parmi les protéines modulant la MEC, on peut citer les métalloprotéases matricielles (MMPs, *matrix metalloproteinase*), les inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPs, *Tissue inhibitor of metalloproteinase*), la plasmine et l'enzyme liante lysyl oxydase (LOX). Les MMPs sont les principales enzymes responsables de la dégradation des composants de la MEC et les TIMPs contrebalancent cette dégradation en inhibant les MMPs¹⁹². L'expression de la plasmine a été rapportée dans les CSH murines et dans les cellules stromales de la moelle osseuse humaine^{193,194}. Cette enzyme participe au remodelage de la MEC par ses capacités de dégradation de la fibronectine et des laminines, et d'activation des MMPs¹⁹⁵. Enfin, l'activation de l'enzyme LOX, exprimée dans les MKs immatures, provoque une réticulation des précurseurs du collagène et de l'élastine^{196,197}.

De façon importante, toute perturbation de l'équilibre entre la synthèse de la MEC, sa dégradation et sa réticulation s'accompagne d'une restructuration conséquente de la matrice¹⁶⁴. Ainsi, une augmentation de la production de MEC est observée chez les patients atteints de myélofibrose primaire, une maladie rare causée par des dérégulations de la voie de signalisation des récepteurs aux cytokines/JAK2/STAT¹⁹⁸. A plus long-terme, la progression de la myélofibrose peut s'accompagner de pathologies malignes ou non malignes affectant sévèrement la production de cellules sanguines. La myélofibrose correspond essentiellement à un dépôt anormal de fibres de collagène de type III (réticuline) et à une augmentation de sa réticulation suite à une surexpression de l'enzyme LOX dans les MKs^{196,199}. Ces remaniements tissulaires se traduisent par une rigidification de la MEC qui pourrait influencer les capacités intrinsèques des MKs à se développer, à se déformer et à traverser la barrière endothéliale. La façon dont les MK détectent et réagissent aux signaux mécaniques n'est pas encore claire. Cependant, on sait que les MK expriment des mécanorécepteurs, tels que les intégrines et certains canaux ioniques (TRPC6, TRPV4, Piezo), connus pour détecter la rigidité de la matrice dans de nombreuses cellules^{200,201}. Une étude a proposé un rôle du canal cationique TRPV4 dans la détection de la rigidité, conduisant à l'activation et à l'internalisation des intégrines β 1, favorisant ainsi la formation de proplaquettes¹⁸². Dans notre laboratoire, nous avons également démontré l'effet de la rigidité du milieu sur la maturation morphologique des MKs et leur capacité à former des proplaquettes. Une des particularités de ce travail a été d'utiliser

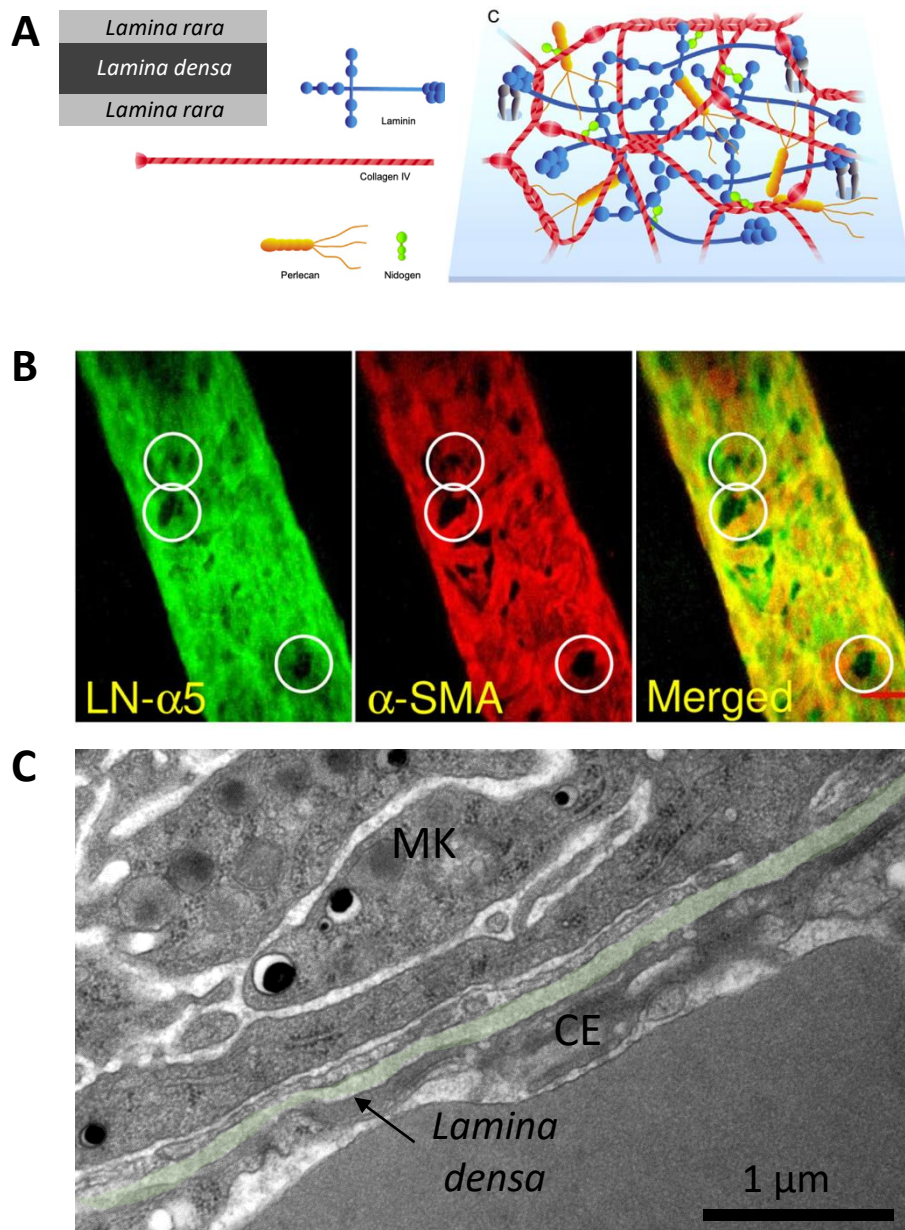


Figure 20 : La lame basale est un réseau de protéines de matrice extracellulaires.

(A) La lame basale s'organise en 2 feuillets de *lamina rara* entourant la *lamina densa*. Les protéines de matrice extracellulaire s'interconnectent et forment un réseau. (B) Par endroits, des zones exemptes de matrice (laminine α 5) coïncident avec des portions de vaisseau non recouvertes par les péricytes (marquage α -SMA). (C) Le feuillet de *lamina densa* apparaît comme une zone grisée localisée sur la face basale des cellules endothéliales en microscopie électronique à transmission. (A) Adaptés d'après Sekiguchi et Yamada, 2018; (B) Wang et al., 2006 ; (C) Eckly A., UMR_S1255




des gels de méthylcellulose (2%) qui, contrairement à la culture liquide, permettent d'encapsuler les MKs et d'imposer sur toute leur surface des contraintes de rigidité proches de celles subies *in vivo* dans la moelle osseuse (15-300 Pa)²⁰².

2.1.3. La lame basale

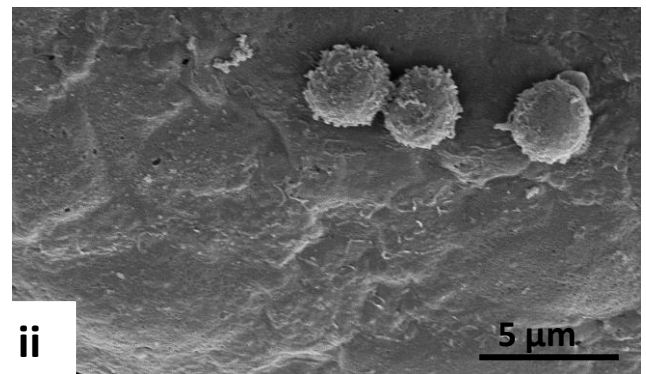
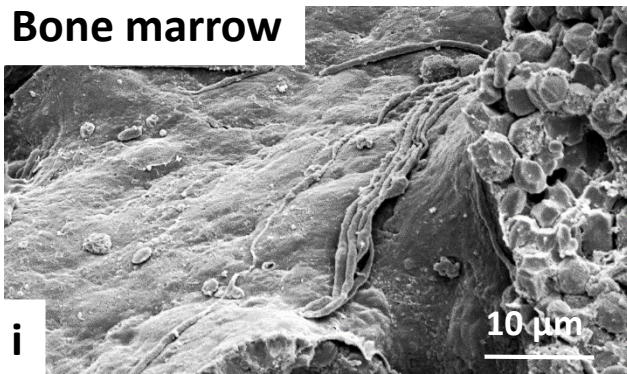
La lame basale représente une matrice d'une autre nature. Composée principalement de laminine et collagène IV, elle forme une sorte de treillis qui enveloppe les vaisseaux tout en délivrant des signaux qui participent à l'homéostasie des tissus.

Architecture et fonctions de la lame basale. La lame basale est une fine couche de protéines de matrice extracellulaire d'environ 100 nm d'épaisseur localisée du côté basal des cellules endothéliales¹⁷⁰. En ME, elle apparaît sous la forme de 3 feuillets superposés : un feuillet central dense aux électrons (lamina densa) et deux feuillets clairs (les lamina rara)^{203,204} (Figure 20). Elle forme un réseau interconnecté de protéines extracellulaires dont la composition varie selon les tissus. Elle est notamment composée de laminines, de nidogène, de perlécan et le collagène de type IV²⁰⁵. D'autres protéines comme la fibronectine ou l'acide hyaluronique s'intègrent à ce maillage de matrice extracellulaire¹⁷⁰. Elle joue un rôle clé pour le maintien physique des composants cellulaires, permettant notamment la délimitation du sous-endothélium. Mais son rôle n'est pas uniquement structural. De par sa composition, elle comprend les ligands des principaux récepteurs d'adhérence. Elle régule ainsi des voies de signalisation intracellulaires essentielles contrôlant l'adhérence, la polarisation ou la migration des cellules^{170,204}. Des mutations des protéines de MEC telles que les laminines, collagènes IV et perlécan conduisent à des syndromes congénitaux graves tels que des dystrophies musculaires, épithéliales ou des néphropathies²⁰⁵. A noter, aucune anomalie dans la numération de plaquettes sanguines circulantes, ni de saignements n'ont été mentionnés dans la littérature concernant ces pathologies.

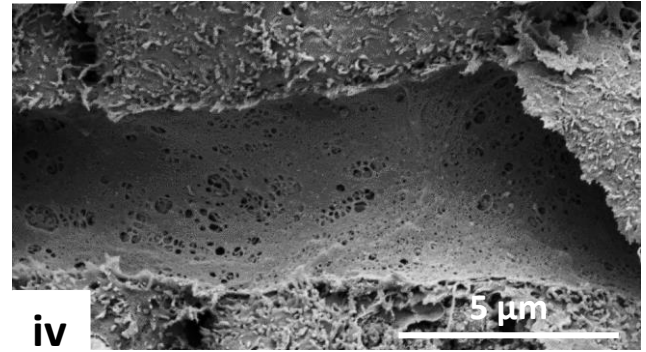
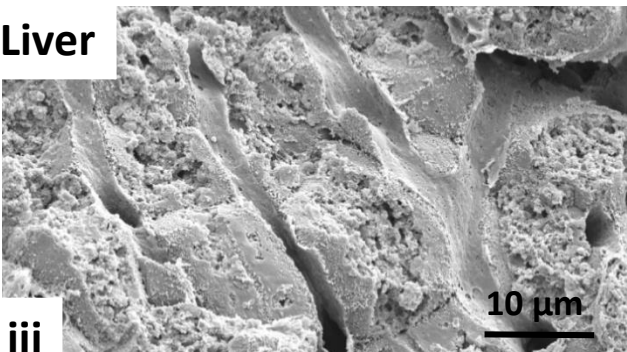
La lame basale des sinusoides est discontinue. Il est intéressant de noter que, contrairement aux artérioles, la lame basale des sinusoides comporte naturellement des brèches. En effet, des études d'immunofluorescence indiquent que la membrane basale des veinules de 20-40 µm de diamètre comporte des régions de faible expression des protéines matricielles. Ces régions coïncident directement avec des zones non recouvertes de péricytes²⁰⁶ (Figure 20). Une analyse en temps réel de la migration de neutrophiles suggère que ces régions constituent des sites de passage privilégié des cellules dont le passage induit

	Arteries	Endosteal arterioles	Sinusoids
Sca-1	+	+	-
Nestin	+	+	-
Diameters	>10 μm	5-10 μm	>20 μm
Permeability	Low	Low	High
Nuclear morphology	 Elongated	 Elongated	 Rounded
2 nd layer of stromal cells	αSMA^+ pericyte	Nestin ⁺ MSCPC PaS MSCPC	n.d.

B Bone marrow



Liver



C

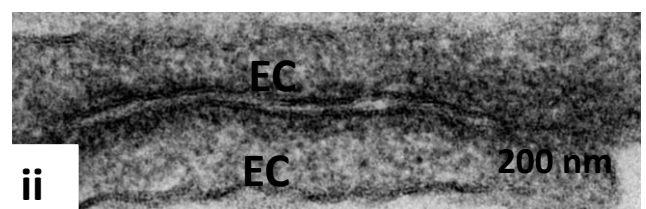
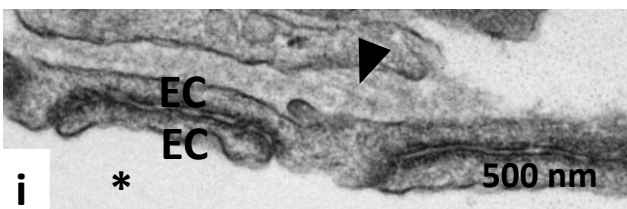


Figure 21 : Caractéristiques distinctes des artérioles et des sinusoides

(A) Caractéristiques des artères, artérioles et sinusoides. D'après Itkins et al, 2016. (B) Images représentatives de SEM montrant que l'endothélium des sinusoides médullaires est continu (i-ii), contrairement à celui des sinusoides hépatiques qui est fenêtré (iii-iv). D'après l'UMR_S1255, Eckly A. (C) Images de TEM montrant la lame basale (i) et la superposition des cellules endothéliales adjacentes (ii). D'après l'UMR_S1255, Eckly A.

un élargissement de ces régions. Dans cette étude, le blocage de l'activité élastase des neutrophiles par l'usage d'inhibiteur ou de souris déficientes n'a pas d'effet sur la transmigration des neutrophiles, suggérant que la dégradation enzymatique ne joue pas un rôle majeur dans ce processus²⁰⁷.

2.2. La composante cellulaire du microenvironnement

La composante cellulaire du microenvironnement englobe toutes les cellules avoisinantes du MK : les cellules résidentes de la moelle (cellules endothéliales, péricytes, fibroblastes, etc) et les cellules adjacentes hématopoïétiques.

2.2.1. Les cellules endothéliales des sinusoides médullaires

Caractéristiques générales de cette barrière. L'endothélium des sinusoides veineux médullaires constitue une barrière anatomique entre l'espace vasculaire et le stroma médullaire. Cette disposition fait de la cellule endothéliale un élément-clé dans le passage des fragments de MK hors de la moelle osseuse. L'endothélium des sinusoides présente des particularités qui lui sont propres, qui le différencie des autres sinusoides (comme par exemple les sinusoides hépatiques fenêtrés) et des artérioles²⁰⁸⁻²¹⁰ (Figure 21). En particulier, il s'agit d'une monocouche de cellules allongées contenant des noyaux ronds et caractérisées par la présence de jonctions serrées faites d'un recouvrement des bords cytoplasmiques. L'endothélium des sinusoides est plus perméable que celui des artérioles et il a été récemment montré que c'est la VE-cadhérine qui régule la perméabilité vasculaire des sinusoides médullaires^{210,211}. L'utilisation d'anticorps bloquants anti- VE-cadhérine augmente la perméabilité des sinusoides, favorisant ainsi l'entrée des CSH dans la moelle osseuse (*homing*). A l'inverse, la stabilisation *in vivo* des jonctions inter-endothélium dans la souris knock-in VE-cadhérine- α -caténine réduit la perméabilité des sinusoides sans pour autant impacter le *homing* des cellules souches hématopoïétiques, indiquant qu'elles empruntent une route transendothéliale grâce à la formation de structures de type podosomes²¹¹. Les cellules endothéliales sont une source importante de cytokines IL6, SDF-1, G-CSF, GM-CSF et LIF permettant de soutenir la prolifération et la différenciation des progéniteurs mégacaryocytaires²¹². Au laboratoire, N. Brouard et C. Jost ont montré que les cellules primaires endothéliales médullaires humaines, à l'inverse des cellules de la microcirculation

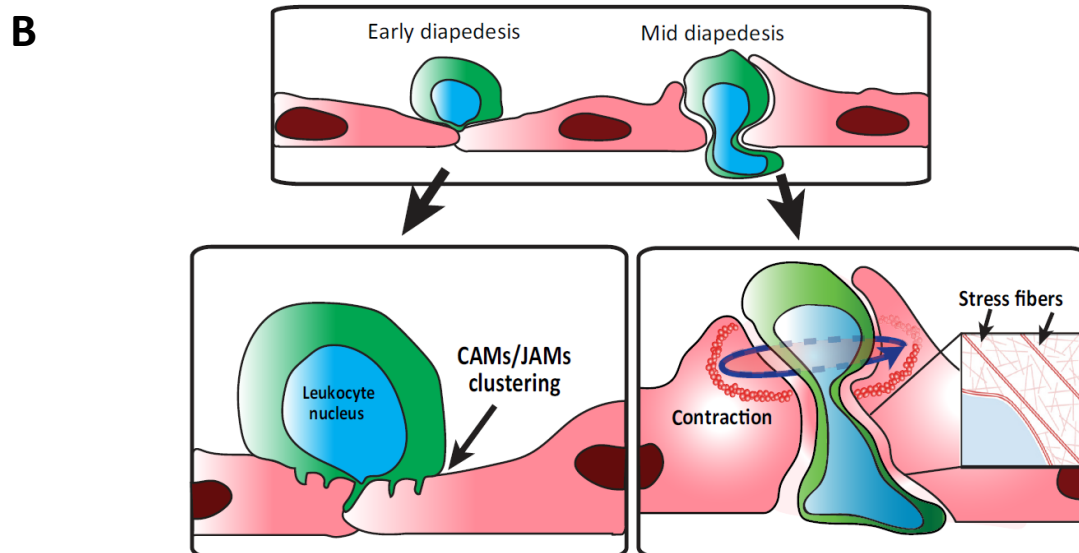
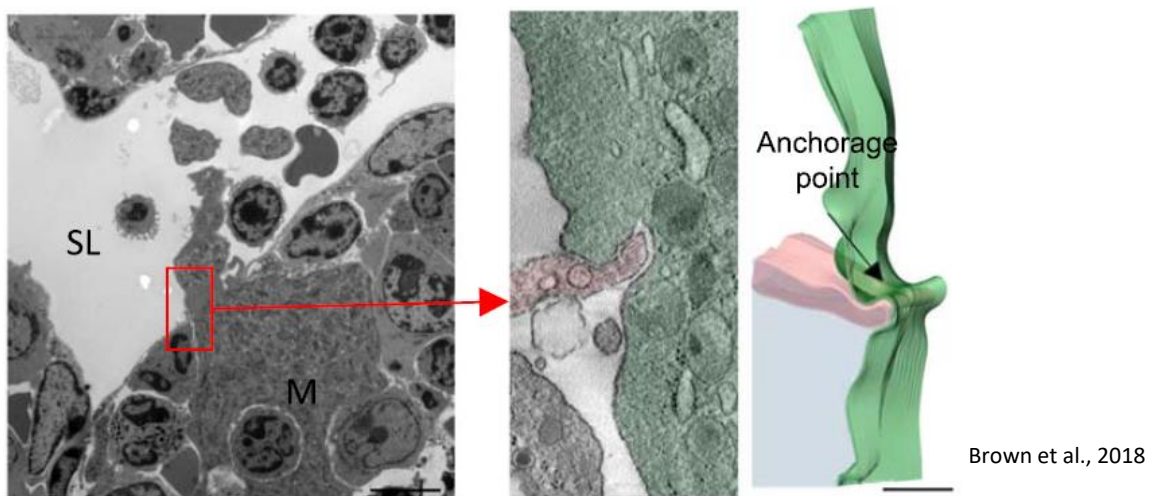
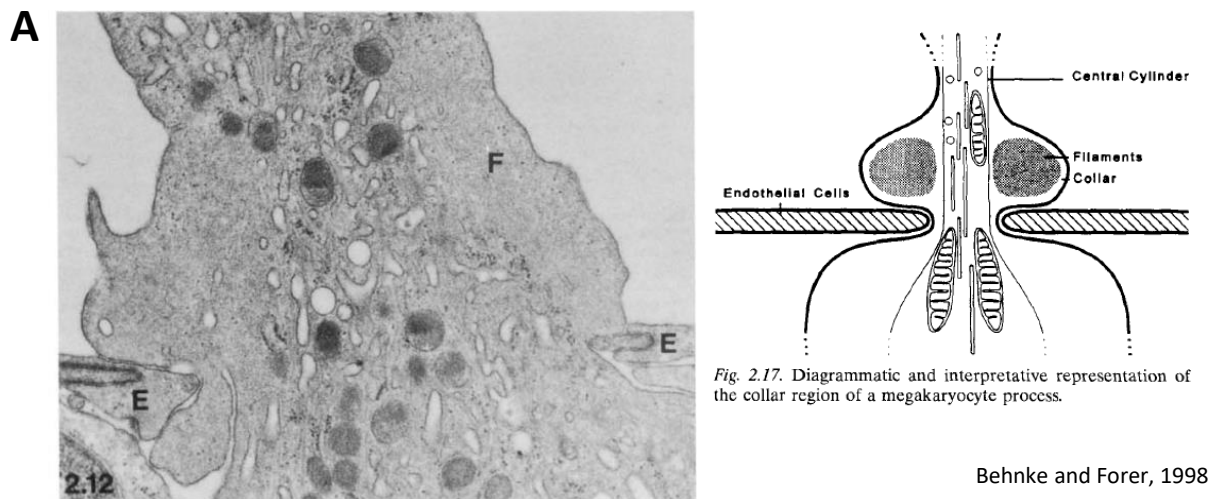


Figure 22 : La barrière endothéliale est active durant la diapédèse leucocytaire.

(A) Les Mégacaryocytes établissent des sites d'ancrage sur la face luminale de la barrière endothéliale. D'après Behne et Forer, 1998 et Brown et al., 2018.

(B) Les leucocytes déstabilisent les jonctions cellulaires (paracellulaire) ou forment des pores au travers des cellules endothéliales (transcellulaire). Au cours du passage le noyau se déforme et comprime la cellule endothéliale, induisant l'organisation d'un anneau d'acto-myosine permettant l'étanchéité du pore endothélial. D'après Alon et van Buul, 2017.

d'autres tissus, favorisaient le développement de MKs producteurs de proplaquettes. Cette propriété ne dépend pas d'un facteur soluble mais d'un contact physique entre les cellules endothéliales et les MKs (manuscrit en cours de rédaction).

Deux modes de passage. En théorie, le passage de la barrière endothéliale peut être transcellulaire (à travers la cellule endothéliale) ou/et paracellulaire (au niveau des jonctions entre deux cellules endothéliales). Peu de données sont actuellement disponibles concernant spécifiquement les MKs dans cette étape. **La voie transcellulaire** pourrait constituer un mécanisme important, compte tenu de l'obstacle majeur que peut représenter la présence de jonctions serrées entre deux cellules endothéliales des sinusoides pour une migration paracellulaire, et cela est l'objet de mon étude (Cf : Axe 1). D'anciennes observations en ME, reposant seulement sur la description de trois MKs, semblent plutôt indiquer un passage transcellulaire^{97,118,213}. Des ouvertures transendothéliales mesurant jusqu'à 6 µm de diamètre ont ainsi été détectés à proximité des jonctions cellule endothéliale-cellule endothéliale, dans la zone la plus fine des cellules. Le mode transcellulaire nécessite la formation de pores mettant en jeu des procédés de fusion membranaires. De manière intéressante, lors de la diapédèse de lymphocytes, il a été suggéré que la formation de macro-ouvertures transendothéliales faisait intervenir le recrutement et la fusion de vésicules et de vacuoles interconnectées appelés VVO (Vesiculo-Vacuolar Organelles) exprimant la protéine ICAM-1²¹⁴. **Le mode paracellulaire** demande, quant à lui, la dissociation des jonctions serrées endothéliales. Différentes molécules, concentrées sur les bords latéraux des cellules endothéliales, pourraient être impliquées dans le processus de transmigration. Il s'agit de PECAM-1, la VE-cadhérine, les protéines JAM et la protéine CD99^{42,93,210}, toutes exprimées à la surface des MKs.

De façon remarquable, nos observations en MET ainsi que celles décrites dans la littérature indiquent que, une fois à l'intérieur du sinusoides, les MKs développent des épaulements riches en actine, à l'aspect de « colliers », ancrés à la face luminale de la paroi endothéliale. On ne connaît pas l'utilité de ces structures mais elles pourraient assurer l'étanchéité du système, à l'image des coupes de migration endothéliales décrites ci-dessous (^{71,125}, observations personnelles) (Figure 22A).

Un rôle actif de l'endothélium durant la transmigration des MKs ? Bien qu'il n'existe pas de données dans la littérature à ce sujet, il est probable que l'endothélium soit un acteur actif dans l'intravasation des MKs, comme cela a été rapporté pour d'autres cellules en

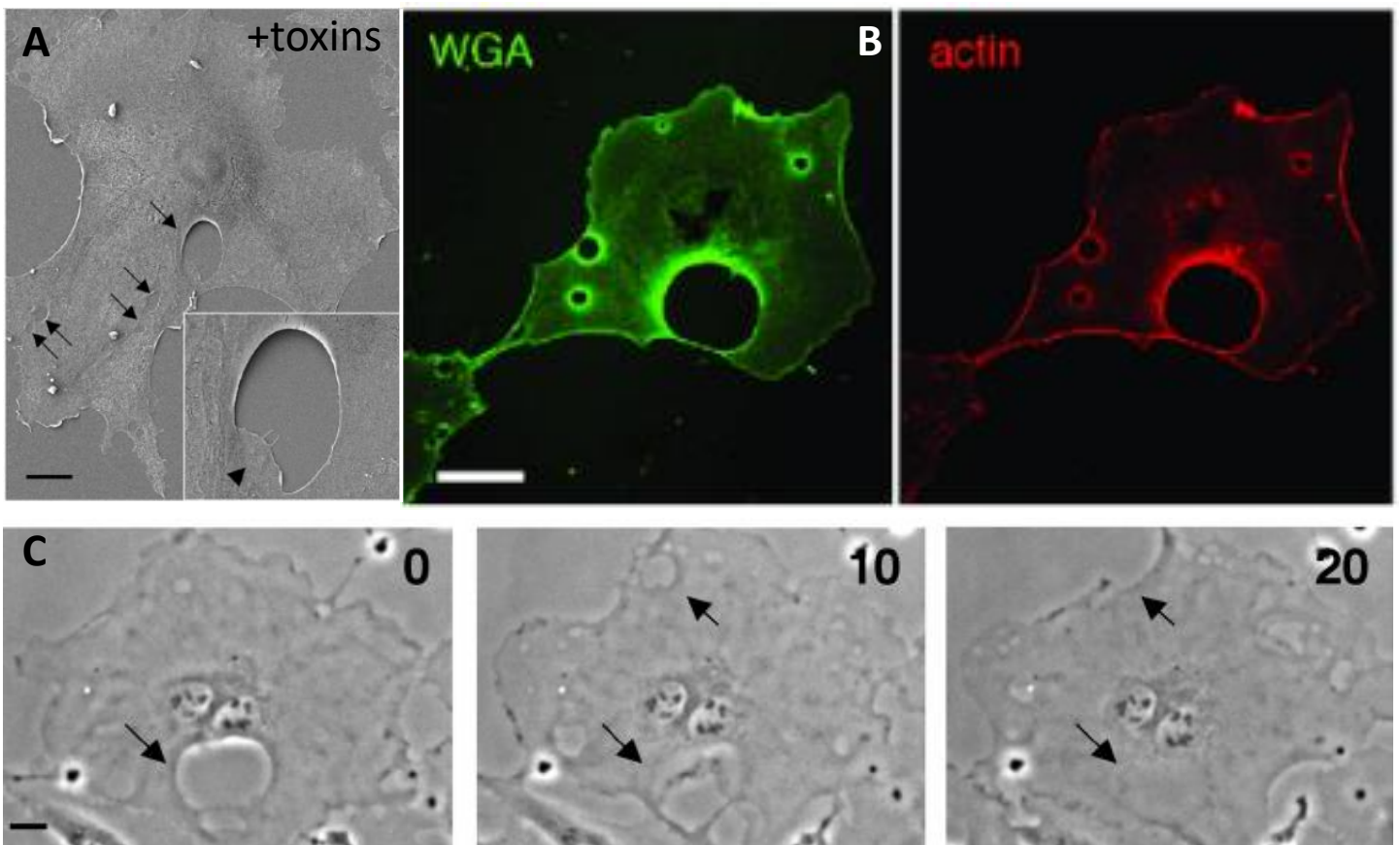


Figure 23 : L'inhibition de RhoA par des toxines bactériennes induit la formation de pores endothéliaux transitoires en déstabilisant le cytosquelette d'acto-myosine.

(A)(B) L'ajout de toxines induit la formation de pores transendothéliaux et désorganise les fibres de stress d'actine qui s'accumule à la périphérie du pore. La membrane plasmique est marquée au WGA (wheat germ agglutinin) (C) Ces pores sont transitoires et se referment dans les 20 min suivant le traitement. D'après Boyer et al., 2006.

diapédèse dans la littérature. Il a été montré que les cellules endothéliales étendaient des prolongements en forme de coupes ou de dômes qui vont entourer et recouvrir en partie les leucocytes au cours de l'extravasation. Ces prolongements endothéliaux appelés « coupes de migration » permettent d'assurer ainsi « l'étanchéité » du système vasculaire²¹⁵ (Figure 22B). Dans le cas de la transmigration des MKs, l'analyse détaillée de la surface endothéliale ne montrent pas de telles structures au-dessus ou au-dessous de MKs en cours de transmigration (observations A. Eckly non publiées). Pour autant, cela ne signifie pas que les MKs et les cellules endothéliales ne coopèrent pas. En particulier, il est connu que les cellules invasives peuvent provoquer **la déformation des noyaux des cellules endothéliales**²¹⁶, également visible lorsque les MKs franchissent l'endothélium. Cette observation soulève plusieurs questions. Existe-il un lien entre les déformations de l'enveloppe nucléaire induites par la cellule invasive et la formation des pores endothéliaux ? Une force appliquée à la surface du noyau stimule un flux de calcium à travers des canaux ionique nucléaires qui pourrait moduler le comportement de la cellule endothéliale²¹⁷. On sait par ailleurs que les cellules endothéliales comportent un réseau dense d'actine et peuvent activement le remodeler afin de faciliter la diapédèse leucocytaire²¹⁵. L'utilisation de toxines bactériennes inhibant RhoA ont permis la description de câbles épais d'actine autour de certaines macro-ouvertures transendothéliales, jouant un rôle important dans la régulation de leur diamètre²¹⁸ (Figure 23). Une autre question est de comprendre la machinerie cellulaire qui sous-tend l'ouverture transendothéliale : élargissement d'un pore préexistant ou fusion des membranes endothéliales apicale et basale ? Ce phénomène étant dynamique, quels sont les signaux perçus par la cellule endothéliale et quels sont les mécanismes impliqués dans leurs fermetures ? Autant d'interrogations qui nécessitent encore la mise en place d'études approfondies.

2.1.2. Autres composants cellulaires associés aux sinusoides.

Les péricytes. Le microenvironnement immédiat des cellules endothéliales est également constitué de cellules stromales telles que les péricytes. Ces péricytes sont enchâssés au sein de la lame basale et organisés de manière discontinue avec de larges plages vides entre les cellules adjacentes puisqu'ils ne se superposent pas. Ces cellules montrent des différences morphologiques et phénotypiques selon le type de vaisseau, le stade de

développement, les espèces et les conditions pathologiques. Le ratio cellules endothéliales/péricytes varie selon les tissus et cette donnée n'est pas connue pour les sinusoides médullaires²¹⁹. De par leur localisation, les péricytes soutiennent l'endothélium et participent à la régulation du diamètre du vaisseau, sa perméabilité et son développement lors de l'angiogenèse²²⁰. Les cellules stromales pourraient également contribuer à la maturation des MKs, soit par une interaction directe entre les cellules, soit par la sécrétion de protéines de la MEC ou de chimiokines^{221,222}. Au niveau cérébral, une étude récente utilisant de l'imagerie intravitale a montré que les péricytes pouvaient être très dynamiques et se réorganiser pour recouvrir le vaisseau²²³. Quelques études font état de l'émigration de neutrophiles dans cette couche via une voie para- ou trans-cellulaire²²⁴⁻²²⁶. Dans des systèmes de co-cultures en matrigel, la présence de péricytes favorise la sécrétion des constituants de la lame basale²²⁷.

Les cellules souches hématopoïétiques. Un deuxième type de cellules associées aux sinusoides sont les CSHs qui, outre leur localisation au niveau de la niche endostéale, sont également situées à proximité de l'endothélium des sinusoides^{228,229}. Enfin, des cellules stromales exprimant le récepteur de la leptine (Lepr⁺) et des cellules CAR (pour *CXCL12-abondant reticular cells*) ont également été identifiées à proximité immédiate des sinusoides²³⁰⁻²³².

Ce chapitre met en avant l'importance des interactions entre le MK et son microenvironnement au cours des différentes étapes de son développement. De par sa diversité constitutionnelle et sa dynamique, la MEC peut moduler le comportement des MKs par l'intermédiaires de récepteurs membranaires dont font partie les intégrines (décrites dans le chapitre 3). La lame basale et la barrière endothéliale constituent deux barrières à franchir. Certaines cellules utilisent des structures particulières appelées podosomes dont les mécanismes de formation et fonctions sont discutés dans la suite (chapitre 4).

Sommaire

3.1. Des récepteurs cellulaires intermédiaires entre matrice et cellules.....	31
3.1.1. La famille des intégrines.....	31
3.1.2. Les différentes conformations des intégrines.....	33
3.1.3. La signalisation bidirectionnelle.....	33
3.1.4. Association des intégrines avec des molécules adaptatrices.....	34
3.2 Intégrines et fonctions cellulaires impliquées dans la transmigration.....	35
3.2.1. L'adhérence cellulaire.....	35
3.2.2. (Trans)Migration	37
3.2.3. L'organisation et le remodelage de la matrice	39
3.2.4. Les intégrines et leurs liens avec le noyau	39
3.3. Les intégrines jouent-elles un rôle dans la formation des plaquettes sanguines ?.....	40
3.3.1. Les données cliniques.....	40
3.3.2. Les données expérimentales.....	41

Les cellules communiquent en permanence avec leur environnement. Les récepteurs cellulaires intégrés à la membrane plasmique servent d'intermédiaire dans cette interaction et permettent de relier le compartiment extracellulaire au compartiment intracellulaire. Nous nous intéresserons ici à une famille particulière de récepteurs, les intégrines qui pourraient être impliquées dans l'interaction des MKs avec la matrice extracellulaire. Les MKs expriment les intégrines de type $\beta 1$ et $\beta 3$.

3.1. Des récepteurs cellulaires intermédiaires entre matrice et cellules

3.1.1. La famille des intégrines

Les intégrines sont les **récepteurs majeurs de l'adhérence** cellulaire à la MEC. Ces récepteurs ont été caractérisés et baptisés intégrines par le groupe de R. Hynes dans les années 1980 en raison de leur intégration dans la membrane et de leur rôle de liaison entre

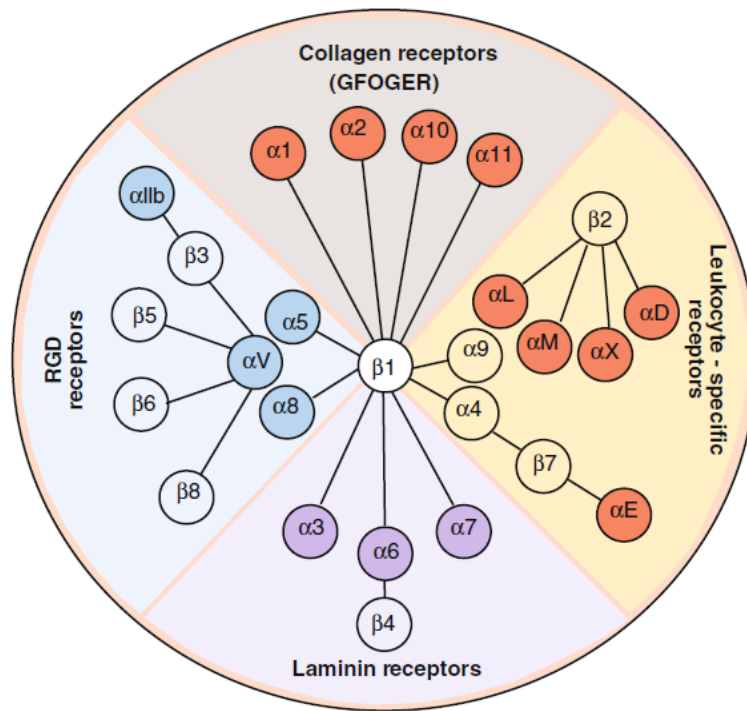


Figure 24 : Représentation schématique de la famille des intégrines.

Les sous-unités α et β se combinent et forment les 24 hétérodimères d'intégrines. Ils sont regroupés selon leur famille de ligands, soit la séquence RGD, soit les collagènes, soit les laminines, en parallèle du groupe d'intégrines spécifiques des leucocytes. D'après Barczyk et al., 2010.

la MEC et le cytosquelette (*integral membrane complex involved in the transmembrane association between the extracellular matrix and the cytoskeleton*)^{233,234}. Elles sont constituées de deux sous-unités, α et β , associées de façon non-covalente. Il existe 18 sous-unités α et 8 sous-unités β dont la combinaison génère 24 hétérodimères fonctionnels qui ont une répartition cellulaire/tissulaire différentes^{235,236}. Les intégrines sont synthétisées et glycosylées au niveau du Golgi et du réticulum, où elles s'associent en dimères. Cette association est une condition obligatoire à la stabilité et à l'expression du dimère au niveau de la membrane.

Les intégrines peuvent être regroupées en fonction de la séquence reconnue dans le ligand matriciel (par exemple, les intégrines α V, α 5, α 8 et α IIb reconnaissent la séquence RGD) ou en fonction de leur combinaison entre sous-unités α et β ²³⁷ (Figure 24). L'association entre sous-unités α et β confèrent la spécificité au ligand. Par exemple, les intégrines α 5 β 1 lient spécifiquement la fibronectine. Bien qu'il existe une redondance entre les intégrines pour la reconnaissance des ligands extracellulaire, celles-ci n'ont pas la même affinité pour ce ligand et elles ne sont pas toutes exprimées dans les mêmes types cellulaires^{238,239}. Ces récepteurs sont des **structures dynamiques** capables de s'assembler, de se désassembler et de changer de configuration, influençant ainsi fortement la physiologie de la cellule en termes de migration, de prolifération, de différenciation et d'organisation de la MEC. Outre qu'elles instaurent **une signalisation bidirectionnelle**, les intégrines sont aussi des **mécanorécepteurs** qui permettent à la cellule de percevoir les propriétés chimiques et mécaniques de la MEC, et ainsi de répondre et de s'adapter à son microenvironnement. Les intégrines ne possèdent pas d'activité enzymatique et n'engagent pas de liaison directe avec l'actine. Leur fonction repose sur l'association de molécules adaptatrices et d'enzymes au niveau de leur domaine cytoplasmique.

La lignée mégacaryocytaire exprime les intégrines de type β 1 et β 3, correspondants aux hétérodimères α 2 β 1, récepteur des collagènes ; α 4 β 1, récepteur de VCAM-1 et de la fibronectine ; α 5 β 1, récepteur de la fibronectine ; α 6 β 1 récepteur des laminines ; α v β 3, récepteur de la fibronectine et vitronectine, et α IIb β 3 récepteur du fibrinogène et du FW.

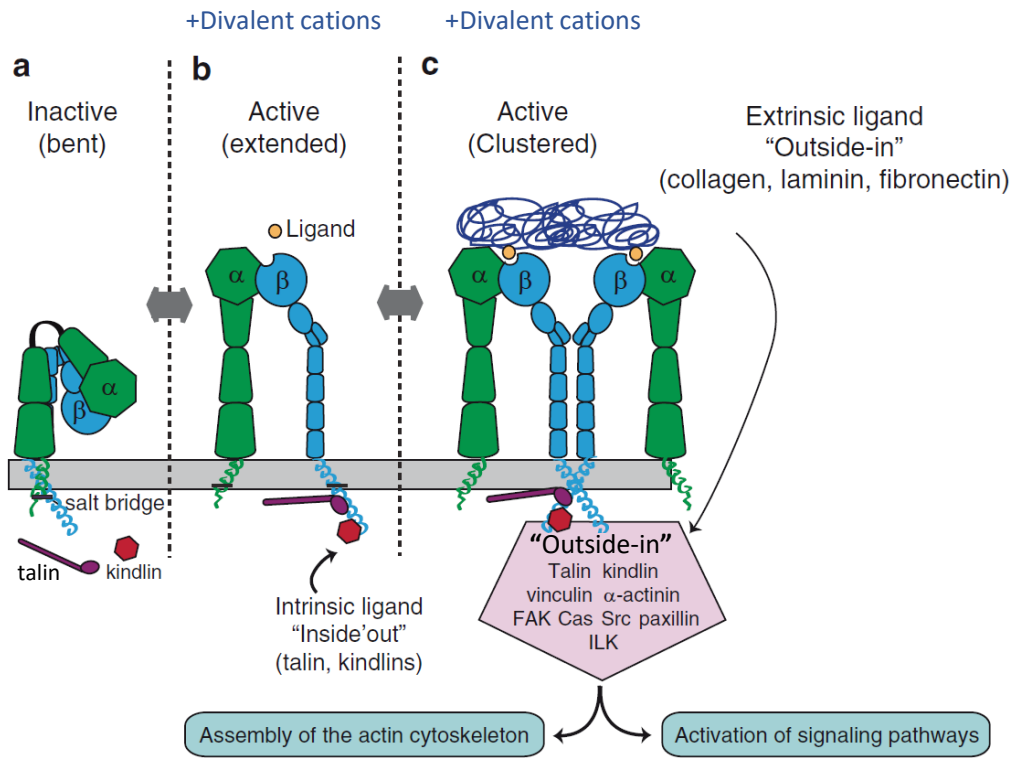


Figure 25 : L'activation des intégrines.

(A) L'intégrine est repliée sous forme inactive. (B) En présence de cations divalents, la liaison de la taline et la kindlin à la queue cytoplasmique de la sous-unité β permet le dépliement de l'intégrine en conformation active, c'est la voie « *inside-out* ». (C) La liaison de ligands extracellulaires induit le regroupement d'intégrines et initie une signalisation interne, c'est la voie « *outside-in* ». Celle-ci conduit au recrutement de protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine ainsi que dans la signalisation. Adapté d'après Zent et Pozzi, 2010.

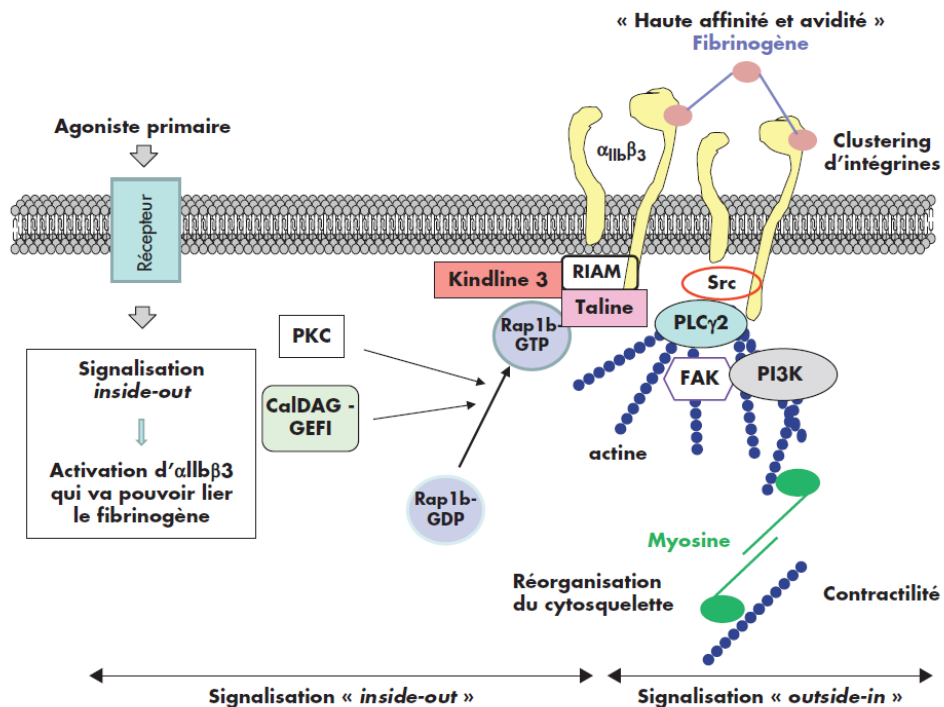


Figure 26 : La signalisation « *inside-out* » et « *outside-in* » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Suite à l'activation de récepteurs membranaires, une première signalisation intracellulaire dite « *inside-out* » conduit à un changement conformationnel de l'intégrine sous forme dépliée, active. Les intégrines se lient à leur ligand, se regroupent en *clusters* et induisent une signalisation dite « *outside-in* » aboutissant à la réorganisation et à la contractilité du cytosquelette d'acto-myosine. Adapté, d'après Payraastre et al., 2014

3.1.2. Les différentes conformations des intégrines

Les intégrines sont au cœur de la transmission des signaux de l'intérieur vers l'extérieur (*inside-out*) puis de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (*outside-in*). En absence de liaison des ions magnésium, calcium ou manganèse, les domaines extracellulaires des intégrines présentent une conformation « repliée » où les sites d'interactions avec leur ligand sont cryptiques, l'intégrine est alors à l'état de repos et présente une faible affinité pour son substrat. La liaison de cations permet aux intégrines d'acquérir une conformation « dépliée » et active d'affinité intermédiaire pour le substrat, avant que les queues cytoplasmiques ne se séparent et que l'intégrine adopte une conformation qui leur permet de lier le ligand extracellulaire avec une forte affinité et induit leur regroupement²³⁵ (Figure 25). Les domaines transmembranaires sont reliés par un pont salin qui est rompu suite à la fixation de certaines protéines sur le domaine cytoplasmique de la sous-unité β telle que la taline, permettant le dépliement et l'ouverture des intégrines²⁴⁰. La partie cytoplasmique des intégrines est généralement courte et sert de plateforme à de très nombreuses interactions, notamment au niveau de certaines sous-unités β qui présentent des motifs NPxY (Asparagine-Proline-x-Tyrosine). Ces motifs sont des sites de phosphorylations par les tyrosine kinases qui régulent l'état d'activation des intégrines et leurs signalisations.

3.1.3. La signalisation bidirectionnelle.

L'état d'activation des intégrines dépend à la fois de leurs liaisons avec leur ligand extracellulaire, de leurs interactions avec leurs partenaires cytoplasmiques et de leur état d'étirement en réponse aux forces extracellulaires et intracellulaires qu'elles subissent (Figure 26). La liaison du ligand extracellulaire provoque un changement de conformation et engage les intégrines dans des voies de signalisation. C'est ce qu'on appelle la signalisation entrante (*outside-in*). En amont, il existe aussi une signalisation sortante (*inside-out*) qui intervient principalement dans la régulation du passage de la forme pliée inactive à la forme dépliée active de l'intégrine. Dans cette conformation ouverte, les deux sous-unités α et β s'éloignent l'une de l'autre et la tête extracellulaire s'étend. Le ligand peut alors se lier dans la cavité libre entre les deux sous-unités. La liaison du ligand extracellulaire permet le regroupement des intégrines (« *clustering* ») et active les voies de signalisation *outside-in* impliquant les protéines kinases FAK, Src et ILK, et conduisant à la réorganisation du cytosquelette d'acto-

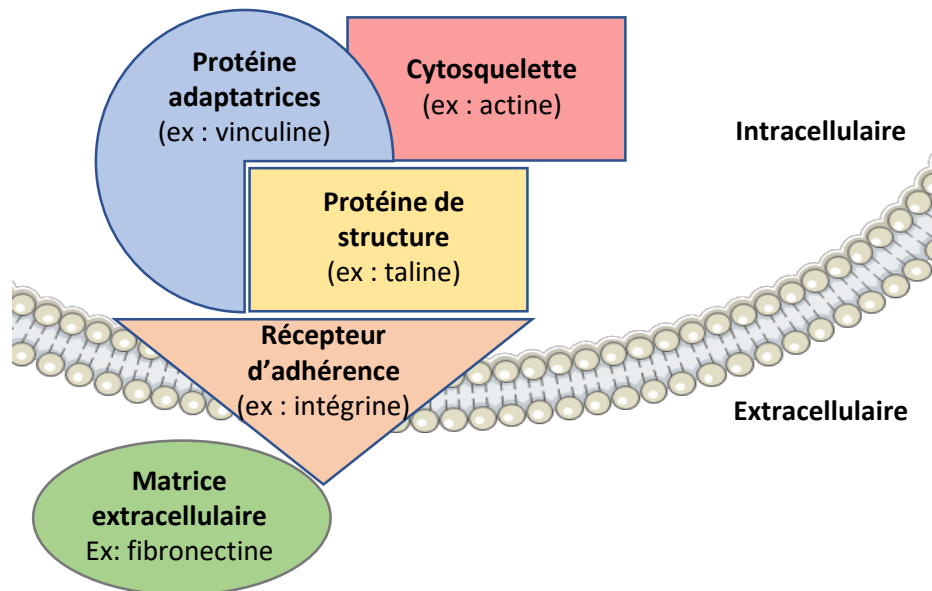


Figure 27 : Représentation schématique d'une structure d'adhérence.

Protéine	Fonction	
α -actinine	Protéines structurales du cytosquelette	Organisation de l'actine
Filamine		Organisation de l'actine
Myosine IIA		Contractilité de l'actine
Taline		Activation des intégrines
14-3-3	Protéines adaptatrices et de signalisation	Adhérence, migration cellulaire
ICAP-1		Régule l'affinité de l'intégrine β 1
Paxilline		Complexes et adhérences focales
FAK	Protéines à activité catalytique	Tyrosine kinase
ILK		Sérine/thréonine kinase
Src		Tyrosine kinase

Tableau 3 : Les protéines associées aux intégrines et aux structures d'adhérence.

Adapté d'après Flier et Sonnenberg, 2001 et Legate et Fässler, 2009

myosine²⁴¹. Différentes voies de signalisation peuvent être activées en fonction des intégrines et de leurs ligands extracellulaires spécifiques (cf partie 3.2.1.).

3.1.4. Association des intégrines avec des molécules adaptatrices.

Suite à leur attachement à la matrice, les cellules acquièrent une morphologie dépendante de la cellule elle-même (type cellulaire, caractéristiques intrinsèques, état de différenciation) et des propriétés moléculaires, structurales et mécaniques de l'environnement. La mise en place des structures d'adhérence fait intervenir une multitude de molécules cytosoliques nécessaires pour stabiliser et renforcer les points d'ancrage à la matrice et initier la signalisation intracellulaire^{242,243}. Leur étude est regroupée sous le concept d'adhésome²⁴³ dans lequel les protéines cytosoliques sont classées en trois grandes familles²⁴² (Figure 27, tableau 3^{244,245}). Premièrement, **les protéines de structure** qui servent d'intermédiaire pour lier la partie cytosolique des intégrines au cytosquelette d'actine. Les plus connues sont la taline ou les kindlines qui sont des régulateurs positifs qui interagissent en synergie pour activer les intégrines. Deuxièmement, **les protéines adaptatrices** qui lient à fois les protéines de structure et l'actine pour consolider le point d'ancrage, telles que la vinculine et l' α -actinine qui lie la taline à l'actine. Enfin, **les protéines de signalisation** telles que Arp2/3, certaines kinases (FAK, Src) ou les Rho GTPases, possédant des activités catalytiques permettant respectivement la polymérisation de l'actine, l'enclenchement de voies de signalisation telles que la voie des MAP kinases et de remaniements du cytosquelette d'acto-myosine^{246,247}. Certaines protéines se lient spécifiquement à une sous-unité (Src et Fyn sur la sous-unité β 3 et ICAP sur la sous-unité β 1) alors que d'autres se lient à plusieurs sous-unités (l' α -actinine, la taline, la paxilline...). Ceci démontre la complexité des voies de signalisation des intégrines, avec l'existence de signalisation croisée entre les intégrines, notamment entre les intégrines β 1 et β 3²⁴⁸.

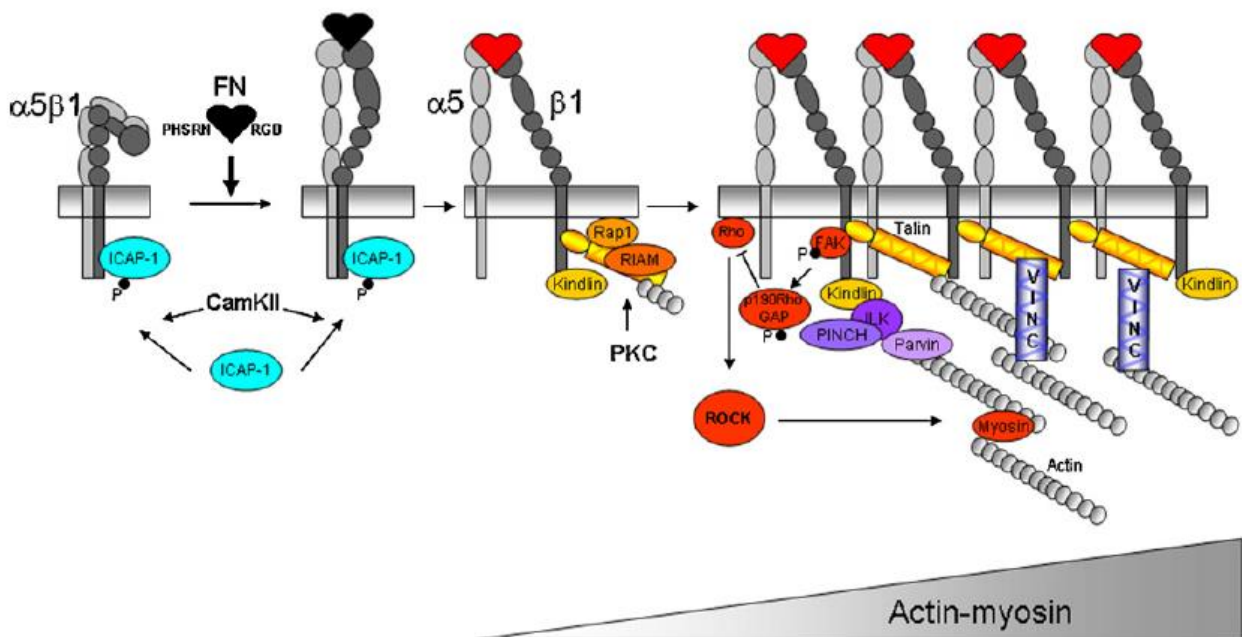


Figure 28 : Formation des adhérences focales.

L'intégrine s'active et se déplie en conformation ouverte. La liaison des intégrines à leur ligand fibronectine induit leur regroupement ainsi que le recrutement des partenaires protéiques permettant leur association au cytosquelette d'actine. Les forces de traction internes influencent la l'organisation des adhérences focales en adhésion fibrillaires. Adapté, d'après Régent et al., 2011

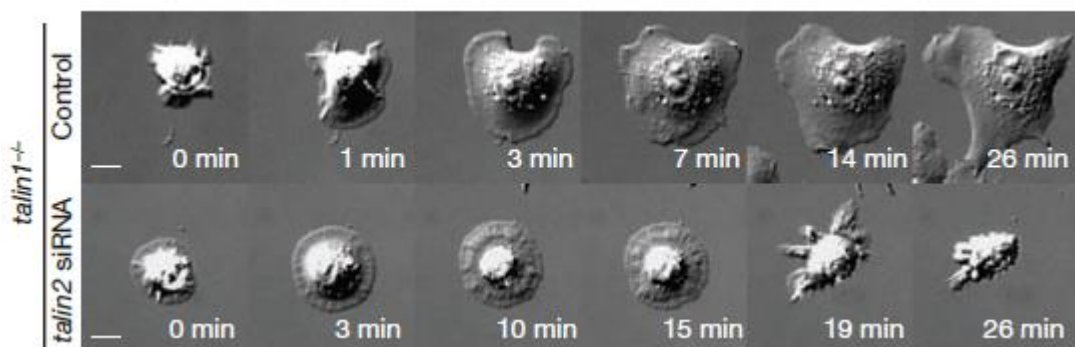


Figure 29 : Les étapes de l'adhérence cellulaire *in vitro* sur une matrice de fibronectine.

La cellule adhère par l'interaction de ses intégrines avec la fibronectine, augmente sa surface d'étalement puis génère des points focaux d'adhésions. Cela permet la génération des forces de tractions associées au substrat et l'étalement de la cellule. La déficience en taline met en lumière que la taline n'est pas nécessaire dans les deux premières étapes d'adhésion et le début de l'étalement cellulaire déclenché par l'interaction intégrine-fibronectine. Alors que l'étalement complet implique le recrutement de la taline, permettant l'augmentation de l'affinité de l'intégrine pour la fibronectine, la formation de points focaux d'adhésion et la génération d'une tension mécanique intracellulaire. D'après Zhang et al., 2008.

3.2. Intégrines et fonctions cellulaires impliquées dans la transmigration

Les intégrines, de par leur lien entre la MEC et l'intérieur de la cellule, activent des voies de signalisation qui contrôlent divers aspects du comportement cellulaire. Dans cette partie, nous allons concentrer notre attention sur les réponses cellulaires susceptibles d'être associées à la transmigration des MKs, notamment l'adhérence, la (trans)migration, le remodelage de la MEC et la déformabilité du noyau.

3.2.1. L'adhérence cellulaire.

Les structures d'adhérence et leur évolution. L'adhérence cellulaire est le résultat de la coopération de différents acteurs que sont la MEC, les intégrines et leurs partenaires, et le cytosquelette. Cette coopération va permettre la formation de structures subcellulaires spécialisées : les structures d'adhérence. Elles sont classées en trois types : les complexes focaux, les contacts focaux et les adhésions fibrillaires¹⁷⁸ (Figure 28). Elles se distinguent par leur morphologie, leur agencement moléculaire, leur dynamique et leur localisation à la surface cellulaire^{249,250}. Lors de la phase initiale d'adhérence, la cellule entre en contact avec la matrice. Ceci favorise l'étalement cellulaire qui permet de nouvelles interactions entre la MEC et d'autres intégrines^{251,252}. Cette deuxième phase est liée à la formation de larges lamellipodes qui permet la protrusion de la membrane plasmique. Une partie des complexes focaux vont fusionner et mûrir en complexes stables de plus grande tailles appelées **adhérences focales**. Lors de cette phase de stabilisation, la cellule développe également des **adhésions fibrillaires** qui correspondent à des structures d'adhérence plus longues. Elles sont caractérisées par la présence de larges fibres de stress structurée par une alternance parallèle de d'actine-F et myosine²⁵³. Cette troisième phase d'étalement est dépendante de l'activation des intégrines par les talines²⁵⁴. En absence de taline, les cellules se rétractent sur elles-mêmes après les deux premières phases de l'étalement (Figure 29).

Les variantes à ces structures, plus spécifiques à l'invasion cellulaire, sont les invadosomes dont les podosomes font partie et qui sont largement décrits dans le chapitre 4, et dont la régulation par les intégrines fera l'objet d'un paragraphe séparé (Cf paragraphe 4.1.3).

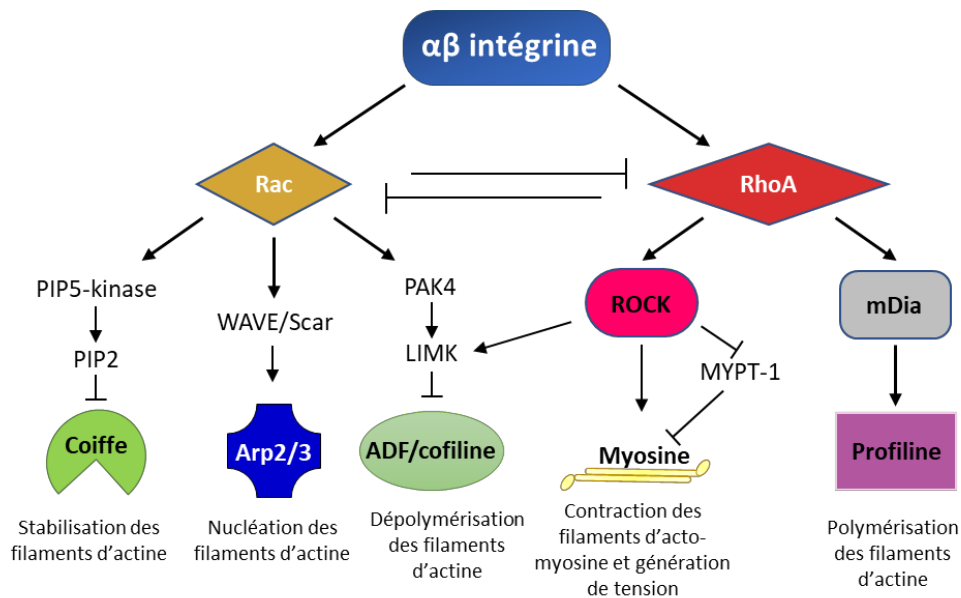


Figure 30 : Régulation des adhérences focales par les GTPases.

Selon Dubash et al., 2009 et Régent, 2011.

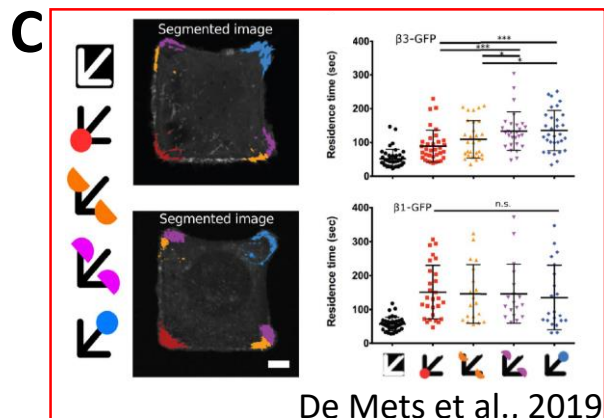
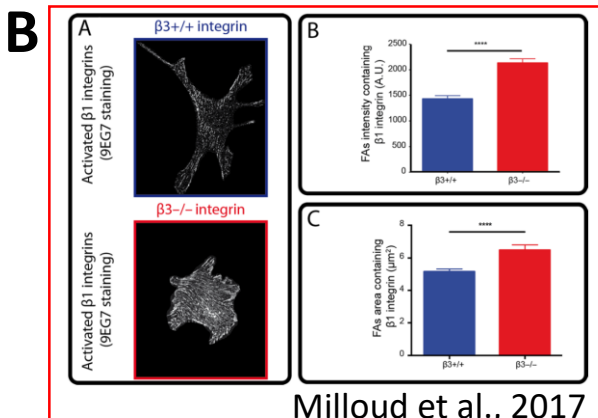
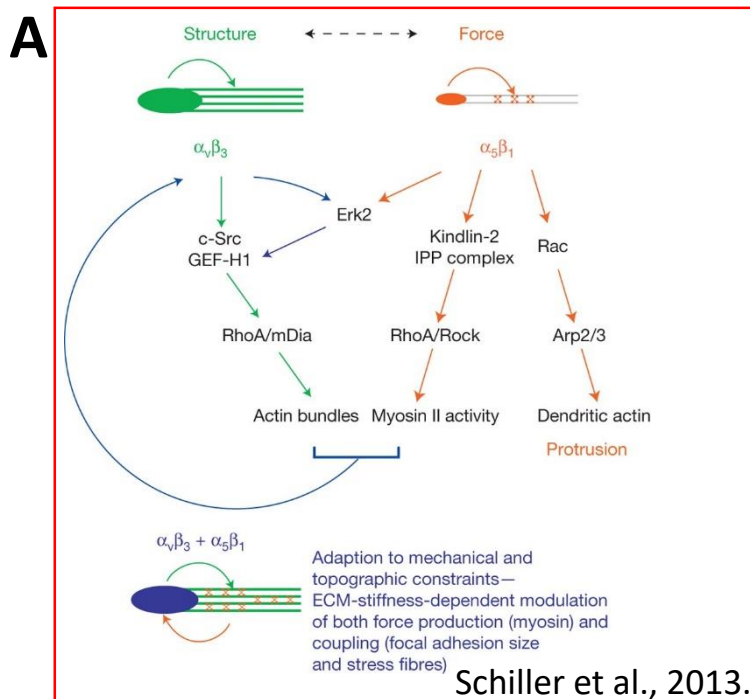


Figure 31 : Rôles distincts des intégrines β_1 et β_3 dans les adhérences focales.

(A) Synergisme des voies de signalisation des intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$ permettant à la cellule de s'adapter aux contraintes mécaniques de son environnement par l'interaction avec un ligand commun, la fibronectine. D'après Schiller et al., 2013. (B) La délétion de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ renforce l'activation de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$. Quantification et images confocales de cellules $\alpha_v\beta_3^{+/+}$ et $\alpha_v\beta_3^{-/-}$ déposée sur de la fibronectine illustrant montrant l'activation de l'intégrine β_1 . D'après Milloud et al., 2017. (C) La tension intracellulaire affecte la mobilité des intégrines β_3 mais pas celle des intégrines β_1 . Quantification et images illustrant les sites d'adhésion dans des régions de tensions variées (symbolisées par des cercles/demi-cercle de couleurs différentes) sur un pattern en forme de flèche. D'après De Mets et al., 2019.

Signalisation d'adhésion. Au cœur de cette signalisation d'adhésion, il a été montré ces dernières années qu'il existait une relation étroite entre les intégrines, les kinases de la famille des Src et FAK, et les GTPases de la famille Rho²⁵⁵. L'engagement de l'intégrine régule l'activité de plusieurs membres de la famille des petites GTPases Rho qui contrôlent la croissance ou la contraction des fibres de F-actine par le biais de protéines telles que Arp2/3 et la myosine²⁵⁶. L'axe de signalisation médié par la GTPase Rac1 stimulent la formation des complexes focaux en diminuant la contractilité corticale *via* une inhibition des voies ROCK et mDia. L'axe de signalisation médié par la GTPase RhoA stimule la formation des adhérences focales *via* son action sur ROCK et sur mDia. ROCK active la chaîne légère de la myosine II à la fois par une phosphorylation directe et indirectement en inhibant sa phosphatase MLCP *via* la phosphorylation de la sous-unité MYPT-1. Ceci permet la formation de myosines II bipolaires et leur interaction avec les filaments d'actine pour s'assembler en fibres de stress contractiles²⁵⁷ (Figure 30).

Rôles distincts des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ dans les adhésions focales. Bien qu'elles lient le même ligand, la fibronectine, il semblerait que les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha V\beta 3$ aient des rôles distincts et coopératifs au sein des adhérences focales²⁵⁸. Ainsi l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ serait importante dans la génération de forces à l'interface cellule/substrat (lié à l'activité de la myosine II), alors que l'intégrine $\alpha V\beta 3$ se verrait attribuer plutôt un rôle dans l'ancrage des cellules dépendante de la tension (lié à la formation de fibres de stress régulée par mDia)²⁵⁸ (Figure 31A). Pour étayer ces propos, il a été montré que les cellules exprimant fortement l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ génèrent des forces plus importantes comparées aux cellules exprimant un niveau plus faible²⁵⁹. En 2017, Milloud et collaborateurs ont montré que les intégrines $\beta 3$ modifiaient la distribution spatiale (le « *clustering* ») des intégrines $\beta 1$ à travers leur capacité à lier la taline et la kindline²⁶⁰ (Figure 31B). Enfin, on sait que l'activité des intégrines est basée sur des cycles d'activation/désactivation. Ceci se traduit par une mobilité des intégrines oscillant entre une diffusion membranaire libre et des événements d'immobilisation transitoires dans les sites d'adhésion^{261,262}. En combinant du « micropatterning » avec une approche d'imagerie tICS (« temporal image correlation spectroscopy ») permettant d'étudier la mobilité des intégrines sur une longue période et sur toute la cellule, De Mets et collaborateurs ont découvert que la tension intracellulaire affectait la mobilité des intégrines $\beta 3$ mais pas celle des intégrines $\beta 1$ (temps de résidence stable)²⁶¹ (Figure 31C).

Que sait-on du rôle des intégrines dans l'adhérence des MKs ? Le rôle des intégrines dans l'adhérence des MKs a principalement été étudié *in vitro* à partir d'observations de MKs déposés sur des protéines adhésives, dont la présence dans la lame basale des sinusoides n'est toujours pas prouvée *in vivo*. Par exemple, il a été montré que les MKs déposés sur du collagène de type I (absent de la lame basale) restent étalés après 16 heures d'incubation, alors que ceux placés sur du collagène de type IV étendent les proplaquettes¹⁸². *In vitro*, les MKs adhèrent également à la fibronectine et la formation de proplaquettes est stimulée par l'activation de ses récepteurs, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 4\beta 1$ sur les MKs^{179,263}. Les MKs adhèrent au fibrinogène via $\alpha IIb\beta 3$ ¹⁷⁹. La présence de fibrinogène au niveau des sinusoides vasculaires de la BM a été décrite par l'équipe de S. Watson qui montre que les MKs, et en se liant au fibrinogène, forment des proplaquettes¹⁸⁵. *In vivo*, dans la moelle osseuse, l'attachement des MKs aux protéines extracellulaires via les intégrines est peu connu. Sur la base de nos observations *in situ* de coupes de moelle osseuse, nous ne distinguons pas de MKs étalés ou aplatis sur les sinusoides, mais plutôt des cellules rondes ancrées aux sinusoides par le biais de zones de contact plates.

3.2.2. (Trans)Migration

Plusieurs études rapportent l'absence de locomotion des MKs (chapitre 1.2.4)⁹⁶. Néanmoins, on peut considérer que les MKs se déplacent depuis le compartiment médullaire vers la circulation sanguine. Cette migration transendothéliale pourrait répondre à certains critères du mode de migration employé par d'autres cellules.

Des stratégies de migration dépendantes ou non des intégrines. La migration cellulaire est un processus complexe composé d'événements d'adhésion et de non-adhésion auxquels s'ajoutent des stratégies cellulaires destinées à surmonter la résistance imposée par la MEC. Dans ce paragraphe, nous n'entrerons pas dans les détails de ce processus, mais allons notamment documenter les travaux de P. Friedl sur la contribution relative des intégrines à la migration selon le type cellulaire²⁶⁴. Le comportement de deux types de cellules a été étudié : 1) les cellules de mélanome MV3 et les fibroblastes qui sont des cellules très invasives, de grandes tailles, polarisées qui migrent à faible vitesse (0,1-0,5 $\mu\text{m}/\text{min}$) et 2) lymphocytes T et cellules dendritiques qui sont des cellules plus petites et très mobiles qui migrent à des vitesses 10 à 40 fois plus élevées que les précédentes²⁶⁵. Les cellules MV3 et les fibroblastes

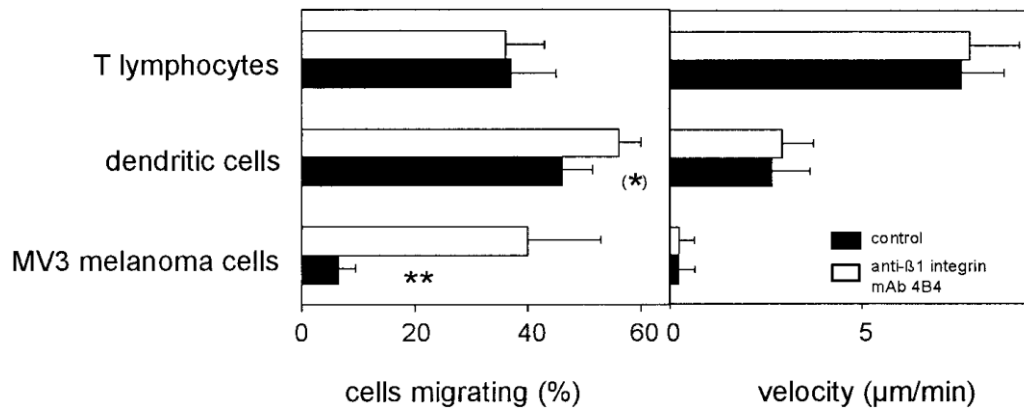


Figure 32 : Rôle des intégrines dans la migration de différents types cellulaires.

Les cellules MV3, les lymphocytes T et les cellules dendritiques sont incluses dans des réseaux de collagène en 3D. Les cellules ont été prétraitées avec l'anticorps bloquant anti-β1 intégrine mAb 4B4 (10 µg/ml) ou du PBS. Le blocage de l'intégrine β1 a un effet sur la migration des cellules dendritiques et des cellules cancéreuses mais pas des lymphocytes T. D'après Friedl et al., 1998.

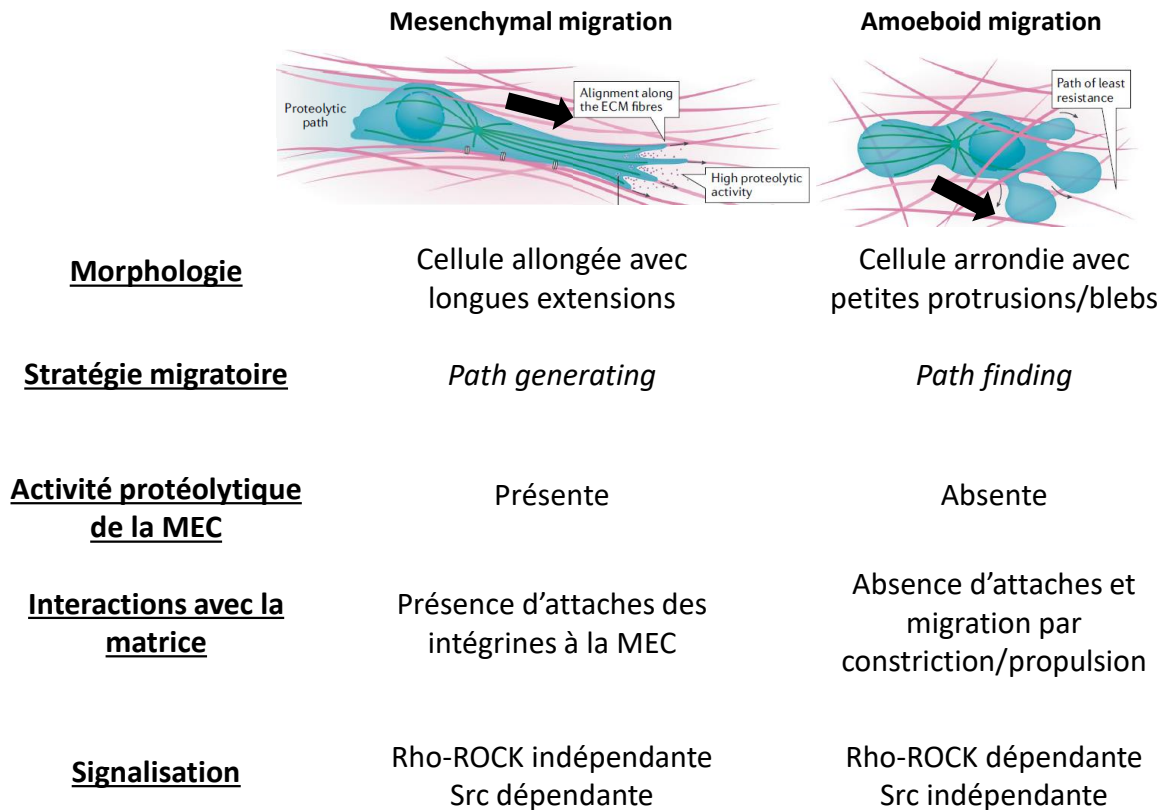


Figure 33 : Caractéristiques des modes de migration mésenchymateuse et migration amoéboïde.
Adapté, d'après Yamada et Sixt, 2019 et Hecht et al., 2015.

utilisent des stratégies de migration adhésive dépendante des intégrines $\beta 1$. Le regroupement de ces intégrines permet, en activant la voie de signalisation liée à la contractilité de l'actomyosine, de générer de force nécessaire pour se créer un chemin de migration (« *path generating* »). C'est le mode de migration mésenchymateuse. En revanche, les lymphocytes T et les cellules dendritiques expriment plus faiblement l'intégrine $\beta 1$ à leur surface. Leur migration se produit en l'absence d'adhésions focales et n'est pas dépendante de l'intégrine $\beta 1$. Leurs déplacements se caractérisent par des contorsions cellulaires qui permettent aux cellules de se faufiler entre les fibres de la matrice en s'attachant de façon transitoires et de courte durée au collagène. Ce déplacement ne nécessite pas/peu de protéolyse de la MEC et est dépendant de la voie de signalisation Rho/ROCK (Figure 32). C'est la migration amiboïde^{266,267} (Figure 33). Dans un autre autre modèle, Blandin et collaborateurs ont évalué la sortie de cellules tumorales de sphéroïdes contenant initialement peu de fibronectine. Ils ont montré que l'ajout d'un coating de fibronectine sur les sphéroïdes diminuait la sortie de cellules tumorales. A l'inverse, l'inhibition de l'intégrine $\alpha 5$ favorisait la sortie des cellules tumorales. Cela suggère ainsi que les interactions entre l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et la fibronectine peuvent jouer un rôle limitant sur la migration cellulaire²⁶⁸. Le mode de migration adopté par les MKs n'est pas documenté à ce jour et fera l'objet d'un point particulier dans les perspectives de l'axe 3.

Que sait-on du rôle des intégrines dans la migration des MKs ? Plusieurs études *in vitro* indiquent que les MKs migrent vers un gradient de SDF-1 α ^{88,269,270}. Ainsi, dans les chambres de Boyden, moins de 20 % des MKs ajoutés à la chambre supérieure migrent au travers des pores de 5 μm en 3 h, sans que ne soit précisé la taille des MKs ayant transmigré^{42,84,88}. Dans ce modèle, la neutralisation de l'intégrine $\beta 1$ par l'utilisation d'un anticorps bloquant empêche la transmigration des MKs. *In vivo*, l'administration de SDF-1 à des souris conduit à une relocalisation rapide, en 1 heure, des MKs au niveau des sinusoides⁹⁰. Plus récemment, Suraneni et ses collaborateurs ont constaté que les MKs déficients pour les dynamines 2 et 3 présentaient un défaut de migration. Les auteurs postulent que ces protéines dirigent la migration *in vitro* des MKs en contrôlant l'expression de l'intégrine $\beta 1$ à la surface des MKs²⁷¹. Ainsi, il apparaît que la contribution réelle des intégrines dans le processus de transmigration des MKs n'est pas comprise.

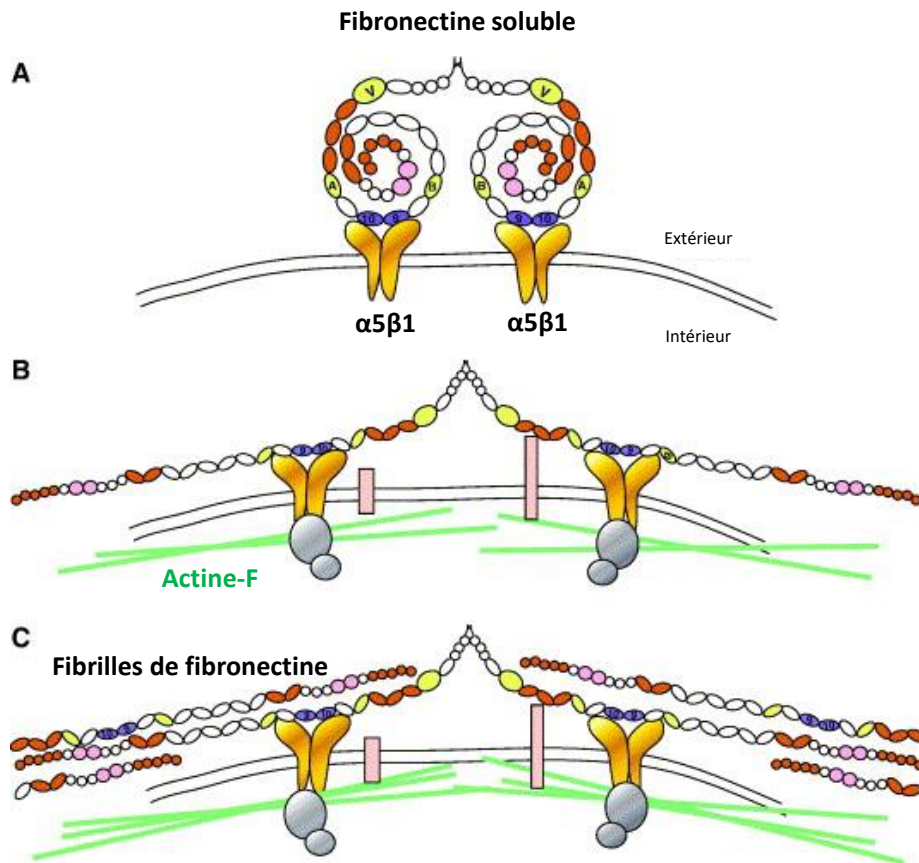


Figure 34 : Le remodelage de la fibronectine se déroule en différentes étapes impliquant les intégrines.

(A) L'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ lie la fibronectine soluble extracellulaire sous forme compacte. (B) Cela induit l'activation d'une signalisation intracellulaire et la réorganisation du cytosquelette d'actine (en vert). L'activité contractile permet un changement conformationnel et un dépliement de la fibronectine, ce qui libère des sites d'auto-assemblage précédemment masqués. (C) Les fibrilles de fibronectine se forment par interactions et alignement de plusieurs molécules de fibronectine dépliées. Adapté, d'après Mao et Schwarzbauer, 2005.

3.2.3. L'organisation et le remodelage de la matrice.

Il est admis que les intégrines influencent le processus de réorganisation et d'assemblage de la MEC à l'échelle nanoscopique. En effet, il a été montré que la liaison des intégrines $\alpha 5\beta 1$ à la fibronectine (FN) le long des adhérences fibrillaires induit l'étirement de la fibronectine, démasquant des sites cryptiques d'auto-assemblage et permettant ainsi la formation de fibres de fibronectine formant une matrice insoluble²⁷² (Figure 34). L'assemblage de la matrice de fibronectine est donc dépendant de son interaction avec l'intégrine mais aussi du cytosquelette et de la contractilité cellulaire²⁷³. Lors de leur recyclage, les intégrines $\alpha 5\beta 1$ exprimées à la membrane plasmique jouent également un rôle dans l'organisation fibrillaire de la fibronectine en internalisant des monomères de fibronectine lors de leur endocytose²⁷⁴.

3.2.4. Les intégrines et leurs liens avec le noyau

Le noyau et la transmigration. Le noyau est l'organite le plus grand et le plus rigide de la cellule. Dans des environnements 3D, les cellules doivent remanier leur noyau, c'est-à-dire sa forme, sa position et sa déformation, pour pouvoir se faufiler à travers des espaces confinés tels que les espaces interstitiels ou effectuer la migration transendothéliale^{275,276}. Par exemple, des travaux menés par le groupe de R. Alon montrent que les lymphocytes T déforment et insèrent les lobes de leur noyau entre deux cellules endothéliales adjacentes pour créer des pores de plusieurs μm de diamètre. Puis le noyau, grâce à sa rigidité, exerce une pression entre les deux cellules, pour passer de l'autre côté. Ce glissement actif du noyau entraîne le déplacement des filaments d'actine des cellules endothéliales, sans nécessiter la contraction endothéliale médiée par la myosine IIA et la Rho kinase²⁷⁷.

Rôle des intégrines dans les modifications nucléaires. Le lien entre les intégrines, le cytosquelette et le noyau a été établi il y a plus de 20 ans par Maniotis et collaborateurs²⁷⁸. Dans leur étude pionnière, les auteurs ont appliqué des contraintes mécaniques directement sur les intégrines de la surface cellulaire en les liant à des microbilles recouvertes de séquence RGD, puis en tirant ces billes latéralement à l'aide d'un micromanipulateur. Ils constatent que le noyau s'allonge dans la direction de la traction et que la distribution des nucléoles varie. En revanche, aucun changement de la forme nucléaire ou de la distribution nucléolaire n'est observé lorsque les billes recouvertes d'AcLDL (*acetylated low density lipoprotein*) sont liées à

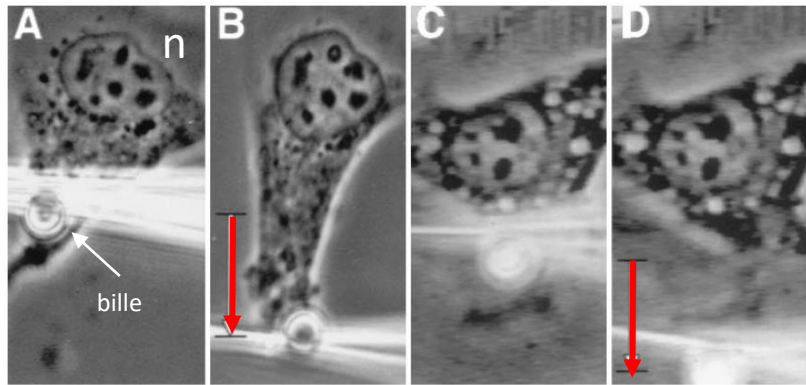


Figure 35 : Démonstration de la connexion mécanique entre les intégrines, les filaments du cytosquelette et le noyau.

Images représentative en contraste de phase de cellules endothéliales avant (A, C) et après (B, D) l'application de contraintes mécaniques (flèches rouges) aux récepteurs de la surface cellulaire. (A et B) Traction d'une microbille recouverte de RGD et (C et D) Déplacement similaire d'une microbille recouverte d'AcLDL liée à la surface. Adapté, d'après Maniotis et al., 1997.

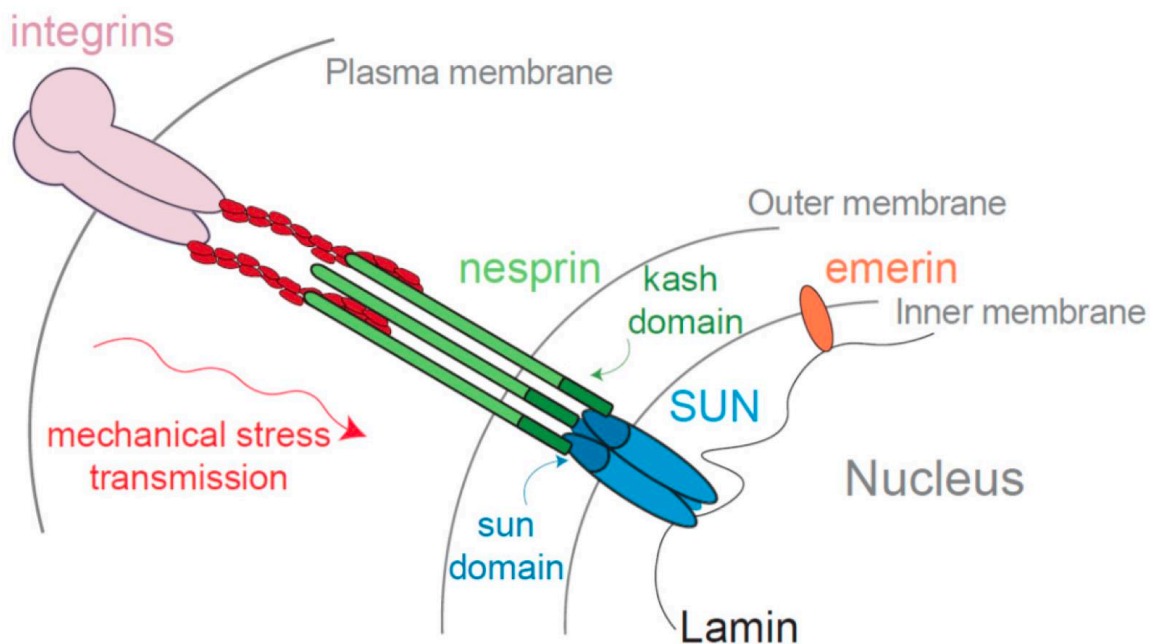


Figure 36 : Les intégrines forment un lien avec le cytosquelette nucléaire via le complexe LINC.

L'intégrine est au cœur d'une liaison mécanique entre la membrane plasmique et le noyau. Cela s'organise par l'intermédiaire des nesprines ancrées dans la membrane nucléaire externe, en interaction avec les protéines SUN de la membrane nucléaire interne elle-même connectée aux lamines nucléaires. Le cytosquelette d'actine connectent physiquement les intégrines de la membrane plasmiques aux nesprines de la membrane nucléaire. D'après Bélaadi et al., 2016

des récepteurs métaboliques transmembranaires non connectés au cytosquelette²⁷⁸ (Figure 35). L'application d'inhibiteurs du cytosquelette d'actine, des microtubules et des filaments intermédiaires empêchent également la déformation nucléaire. Les auteurs concluent que la connexion entre la membrane plasmique et le noyau est spécifiques aux intégrines et est médiée par des liens directs entre les trois systèmes de filaments du cytosquelette. Ce n'est que 12 ans plus tard que Wang *et al.* décrivent la composition de l'enveloppe nucléaire et ses connexions potentielles avec la membrane plasmique. L'enveloppe nucléaire est constituée de deux membranes nucléaires interne (MNI) et externe (MNE) et délimite le compartiment dans lequel la chromatine est séquestrée. Les complexes protéiques essentiels qui y sont associés sont les lamines et les complexes LINC (*Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton*). Les lamines forment le squelette des noyaux et le complexe LINC, formé par l'association des protéines SUN et Nesprines, constituent le lien physique entre le cytosquelette d'actine, lié aux intégrines, et les lamines nucléaires. L'ensemble formant ainsi une liaison mécanique entre la matrice extracellulaire, la membrane plasmique et le noyau^{279,280} (Figure 36).

A ce jour, la relation entre les intégrines et le noyau polylobé des MKs reste une question encore ouverte.

3.3. Les intégrines jouent-elles un rôle dans la formation des plaquettes sanguines ?

La présence d'une numération plaquettaire normale, bien que située dans la fourchette basse, chez les patients ayant un déficit constitutionnel en intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ a très longtemps fait évoquer que les intégrines n'étaient pas impliquées dans la mégacaryopoïèse. Récemment, de nouvelles observations cliniques et expérimentales sont venues nuancer cette hypothèse en apportant de nouvelles données sur l'importance des intégrines dans la production des plaquettes.

3.3.1. Les données cliniques.

Sur le plan clinique, des mutations au niveau des gènes codant pour les intégrines $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (intégrine la plus exprimée sur la plaquette avec ~80.000 copies/plaquette) se traduisent par une maladie hémorragique connue sous le nom de thrombasthénie de Glanzmann. Elle se caractérise par des saignements dus à un défaut d'agrégation des plaquettes mais la grande

majorité des patients ne présentent pas d'anomalie majeure de la thrombopoïèse (numération basse sans thrombopénie et morphologie plaquettaires normales, pour rappel la numération plaquettaire de la population française adulte est comprise entre 162.000 et 445.000 plaquettes/ μl ²⁸¹), laissant présager un rôle mineur de cette intégrine dans la biogénèse des plaquettes²⁸². A l'échelle mondiale, seules huit familles de patients ont été décrites comme présentant une thrombopénie allant de 22.000 et 113.000 plaquettes/ μl . Chez ces patients, les mutations sont majoritairement localisées au niveau de la queue intracytoplasmique des intégrines, entraînant un gain de fonction des intégrines²⁸³⁻²⁸⁶. Pour déterminer l'origine de la thrombopénie, la formation des proplaquettes a été évaluée *in vitro*, en culture liquide, à partir de progéniteurs circulants. Ces études s'entendent sur une diminution du nombre de pro-plaquettes avec une augmentation de la taille des boutons plaquettaires. Au niveau plaquettaire, chez certains patients, il a été constaté la présence de marqueurs de signalisation *outside-in* (FAK phosphorylée, liaison PAC-1) dans les plaquettes au repos témoignant d'un état de pré-activation des plaquettes, ainsi que d'une altération de la polymérisation d'actine après stimulation, les auteurs suggèrent alors que les mutations gains de fonctions d' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ altèrent la biogénèse des plaquettes en facilitant l'interaction des MKs avec le stroma et en favorisant la réorganisation du cytosquelette²⁸⁵⁻²⁸⁷.

3.3.2. Les données expérimentales.

Chez la souris, la littérature rapporte que l'inactivation des gènes codants pour les intégrines β1 ou β3 n'impacte pas significativement la numération plaquettaire^{98-100,172}. Seule une légère diminution du volume moyen plaquettaire a été relevée chez un knockout α2 spécifique à la lignée MK (diminution de 19%) suggérant, là-encore, une implication mineure des intégrines dans la thrombopoïèse. Toutefois, un rôle des intégrines dans la mégacaryopoïèse n'est peut-être pas complètement éliminé. En effet, l'inhibition de la voie de signalisation *outside-in* de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ par le lotrafiban réduit significativement la formation des proplaquettes *in vitro*¹⁸⁵. Dans une autre étude, l'inhibition de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ par des anticorps bloquants diminue l'adhérence des MKs au fibrinogène et au FW, sans affecter la capacité des MKs à émettre des proplaquettes²⁸⁸. L'étude d'un patient présentant une macrothrombopénie liée à une mutation de la filamine A, révèle que l'interaction entre l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ et la filamine A est essentielle à la formation de proplaquettes²⁸⁹.

Plus récemment, le groupe de K. Hoffmeister a rapporté que l'hyperactivation des intégrines β1 impactait la production plaquettaire. Ce résultat repose sur des observations

réalisées dans des souris déficientes en β -1,4-galactosyltransferase 1, une enzyme responsable de la glycosylation des protéines de surface incluant les intégrines. Les auteurs montrent ainsi que la perte de galactosylation des intégrines β 1 conduit à leur hyperactivation. Ceci affecte le développement des MKs (DMS sous-développé délimitant peu de territoires cytoplasmiques) et leur apposition aux sinusoides et, de ce fait, conduit à une thrombopénie sévère (réduction de la numération plaquettaire de 60%)²⁹⁰. En lien avec cette étude, il a été rapporté qu'une activation constitutive des intégrines liées à l'inactivation de RASA3 (une GTPase de la famille GAP1 qui cible Ras et Rap1) entraînait de multiples anomalies mégacaryocytaires (développement, adhérence, organisation du cytosquelette d'actine, production des proplaquettes) associées à une thrombopénie sévère (réduction de 80% de la numération plaquettaire), des saignements et même de la myélofibrose²⁹¹. C'est d'ailleurs dans le contexte pathologique de la myélofibrose que, l'année dernière, K. Ravid et collaborateurs ont découvert le rôle de l'intégrine α 5 β 1 dans la mégacaryopoïèse. En effet, lors d'une myélofibrose primaire associée à la mutation V617F+ de JAK2, l'accumulation de fibronectine dans la moelle s'accompagne d'une surexpression de la sous-unité α 5 sur les MKs. L'augmentation de la capacité de ces MKs à adhérer à la fibronectine est reversée par l'injection d'anticorps bloquant anti- β 1 à la souris. De façon importante, les auteurs valident l'interaction « intégrine α 5 β 1/fibronectine » dans des patients atteints de myélofibrose primaire²⁹².

En résumé, l'ensemble de ces études indiquent des résultats contradictoires qui ne permettent pas d'établir précisément un rôle des intégrines dans biogénèse des plaquettes. Par ailleurs, on sait que les intégrines sont impliquées dans des structures d'adhérence appelées podosomes dont les fonctions permettent l'invasion cellulaire et leur passage transendothélial. Ces structures font l'objet du chapitre suivant.

Sommaire

4.1. Une structure d'adhérence particulière : le podosome.....	44
4.1.1. Les principales caractéristiques des podosomes.....	44
4.1.2. Focus sur le cytosquelette des invadosomes.....	46
4.1.3. Régulation de la formation des podosomes.....	48
4.2 Tour d'horizon sur les fonctions des invadosomes.....	49
4.2.1. Adhérence et dégradation de la matrice extracellulaire.....	49
4.2.2. Remodelage de la matrice par la force du cytosquelette d'actine	51
4.2.3 L'invasion cellulaire.....	52
4.3. Les mégacaryocytes forment des podosomes <i>in vitro</i>.....	54
4.3.1. Les podosomes des mégacaryocytes.....	54
4.3.2. Déficits touchant un élément de signalisation commun aux podosomes.....	56

Pour aller plus loin dans l'étude de la transmigration, cette partie de l'introduction cible les podosomes, des structures d'adhérence cellulaire et de dégradation. Ils forment une classe de structures adhésives uniques dont les propriétés, en particulier leur capacité à concentrer des métalloprotéases, diffèrent de celles des autres structures d'adhérences membranaires (complexes focaux et adhérences focales). Ils ont été identifiés dans les MKs et l'élucidation de leur fonction pourrait constituer un enjeu majeur en termes de physiopathologie de la formation des plaquettes sanguines.

Ce chapitre est séparé en trois sections. Les deux premières donnent la vision actuelle de la structure des podosomes et de leurs fonctions dans des cellules telles que les macrophages, les ostéoclastes ou les cellules tumorales, qui pourraient constituer des modèles d'étude pertinents pour une meilleure compréhension des podosomes dans le MK. La troisième section est liée aux connaissances de ces structures sur les MKs.

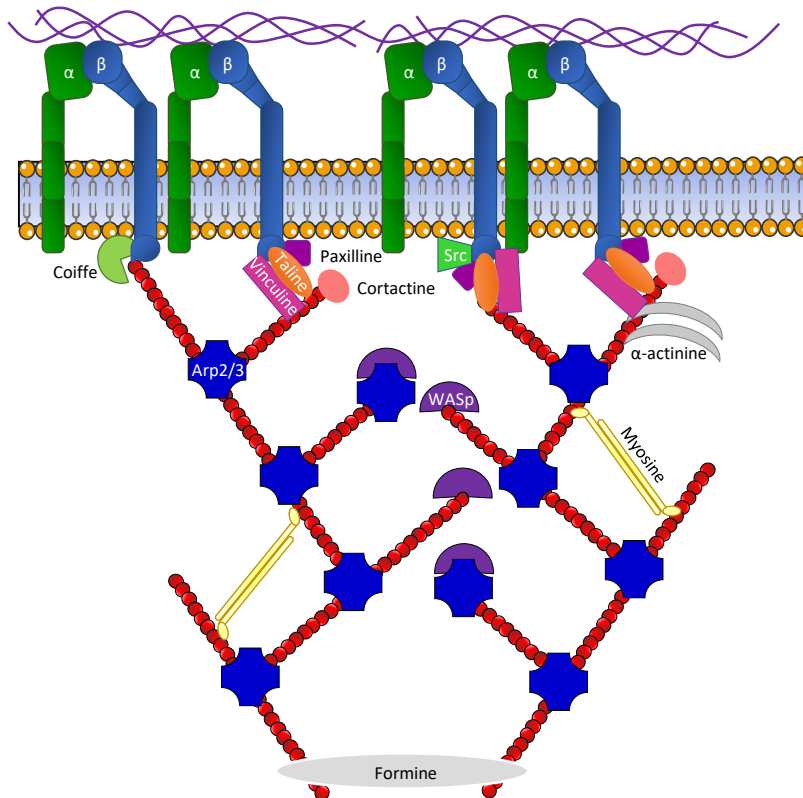
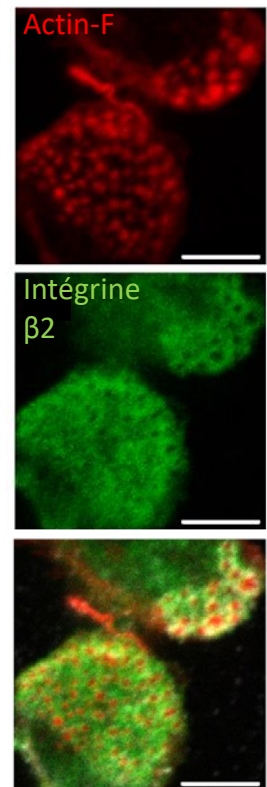
A**B**

Figure 37 : La structure de base du podosome.

(A)(B) La structure moléculaire du podosome se définit par un cœur d'actine perpendiculaire au substrat et entouré d'un anneau de protéines formant un complexe d'adhérence basé sur les intégrines. (A) Inspiré, d'après Régent, 2011 et Schachtner et al., 2013. (B) Adapté, d'après Gawden-bone et al., 2014.

4.1. Une structure d'adhérence particulière : le podosome

4.1.1. Les principales caractéristiques des podosomes

Les podosomes appartiennent à la famille des invadosomes. Les podosomes sont des microdomaines d'adhérence formés au niveau de la membrane plasmique de la face ventrale des cellules déposées sur de la MEC. Ils s'organisent en structures cylindriques à base d'actine filamenteuse (actine-F) et sont orientés perpendiculairement au plan de la cellule. Les podosomes consistent en un cœur d'actine-F associée à des protéines régulatrices (telles que la cortactine, Arp2/3, WASp), entouré d'un anneau de protéines structurales et de signalisation (paxilline, vinculine, taline, intégrines)²⁹³⁻²⁹⁵ (Figure 37). Ce sont des structures extrêmement dynamiques qui se forment, fusionnent, se dissolvent en permanence avec une demi-vie comprise entre 2 et 20 min. Une de leurs caractéristiques est leur richesse en métalloprotéases leur conférant une activité de dégradation de la MEC.

Initialement découverts dans des fibroblastes transformés par le virus du sarcome de Rous (porteur de l'oncogène v-src), les podosomes ont ensuite été mis en évidence dans des cellules en condition physiologique ayant des propriétés d'invasion tissulaire, telles que les macrophages²⁹⁶, les cellules dendritiques²⁹⁷, ou les ostéoclastes²⁹⁸. Par la suite, des podosomes « inductibles » ont été caractérisés dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses après stimulation par des cytokines ou des esters de phorbols^{299,300}. Les podosomes de cellules transformées par v-src, et plus largement des cellules tumorales, ont été renommés invadopodes, une dénomination qui reflète leur puissante capacité à dégrader la matrice cellulaire, leur architecture caractéristique (protrusions plus longues que celle des podosomes) et leurs propriétés dynamiques (demi-vie d'environ 1h, plus élevée que celle des podosomes)³⁰¹. Cependant, dans certaines conditions de culture, les podosomes peuvent également correspondre à de longues extensions qui dégradent la MEC, suggérant une relation étroite entre les podosomes et les invadopodes³⁰². Pour faciliter leur description, le terme invadosome a récemment été adopté pour désigner les deux structures, en proposant que les invadopodes et les podosomes puissent s'adapter et même s'inter-échanger en réponse au microenvironnement³⁰³⁻³⁰⁶.

La visualisation des podosomes. Extensivement décrits *in vitro* en 2D, les podosomes sont généralement visualisés par co-marquage des cellules avec de la phalloïdine fluorescente se liant à l'actine-F, et d'autres protéines localisées autour du cœur d'actine. Parmi celles-ci, on

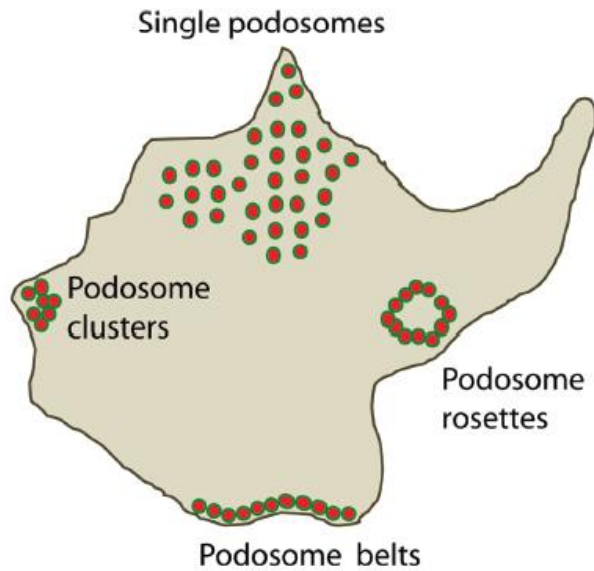
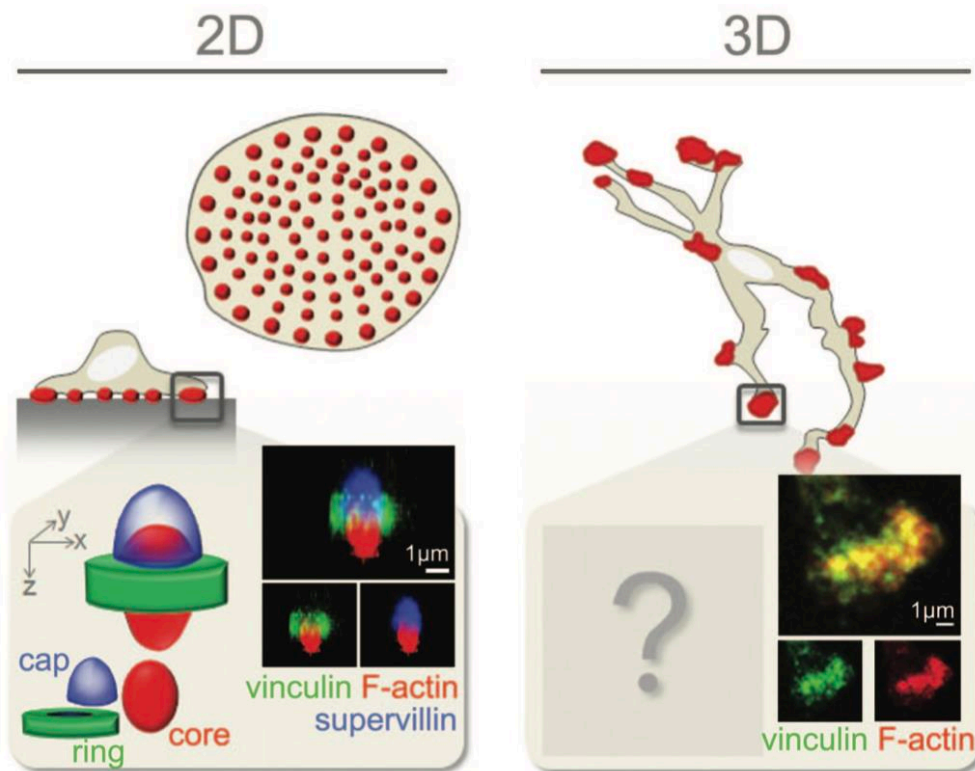


Figure 38 : Les différentes configurations des podosomes en 2D.
Adapté, d'après Schachtner et al., 2013



Parameters	2D	3D
Number of podosomes	50- >100 /cell	2-9 /cell
Spatial organization	equidistant pattern	tip of protrusions
Organization	core, ring, cap	no defined architecture
Diameter	0.5-1 μm	ca. 5 μm
Life time	ca. 1 min (precursor) > 5 min (successor)	ca. 5 min
Matrix degradation	+	+

Figure 39 : Différences de distribution et caractéristiques des podosomes en 2D et en 3D.
D'après Wiesner et al., 2014

trouve la paxilline, la vinculine et la taline, qui connectent le cytosquelette à la membrane plasmique pour assurer l'amarrage du podosome à la matrice via des intégrines de type $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$. Les podosomes peuvent se présenter sous différentes configurations, 1) sous la forme de ponctuations individuelles réparties sur l'ensemble de la surface ventrale, 2) assemblés en superstructure de forme circulaire (rosettes) et par groupes, ou 3) sous forme linéaire²⁹⁵ (Figure 38). Ces organisations varient selon le type de cellule, l'état de la cellule et le substrat inducteur. Ceci a clairement été démontré pour les ostéoclastes dont la motilité, l'adhérence et la sécrétion sont contrôlés par la distribution subcellulaire des podosomes. Ainsi, lorsque l'ostéoclaste est en mouvement, on observe peu de podosomes et ils restent confinés au bord antérieur de la cellule. Lors de la phase d'attachement à l'os, le nombre des podosomes s'accroît, et ils s'organisent d'abord de manière centrale puis en un anneau périphérique. Lorsque la cellule s'engage dans le processus de la résorption osseuse, une zone de scellement hermétique (*sealing zone*) correspondant à une large bande circulaire formée de podosomes étroitement associés, se constitue, isolant la partie sécrétoire de l'environnement³⁰⁷. Il a été montré que chacune de ces structures dérivait de la réorganisation de la précédente²⁹⁸.

La culture cellulaire en 3 dimensions (3D), utilisée pour imiter plus fidèlement l'environnement *in vivo*, a fait l'objet d'attention grandissante ces dernières années. Il a ainsi été montré que les podosomes formés par des macrophages cultivés en 3D dans du collagène fibrillaire (collagène I ou matrigel) ont un aspect bien différent que *in vitro* en 2D. Ils apparaissent à l'extrémité de longues protubérances et on les appelle alors 3D-podosomes^{308,309} (Figure 39). Ces structures semblent se former lors de la migration mésenchymateuse des cellules et de façon protéases-dépendante³¹⁰⁻³¹². Les 3D-podosomes ont une composition moléculaire similaires à ceux décrits en 2D, mais l'architecture classique du cœur d'actine-F et de l'anneau périphérique n'est pas présente. Ils sont de plus grande taille (environ 5 μm de diamètre versus $<1 \mu\text{m}$ en 2D) et moins nombreux (2 à 3 3D-podosomes/cellule versus >100 podosomes/cellule en 2D)³¹³.

Malgré de bonnes descriptions de podosomes dans des systèmes 2D et en 3D, il existe actuellement peu de données concernant les podosomes *in vivo*. La question de leur rôle *in vivo* reste donc actuellement ouverte.

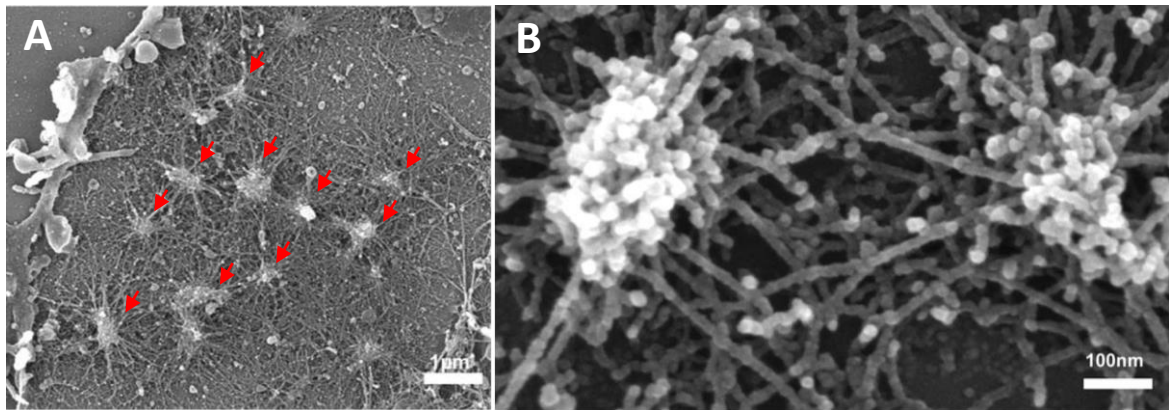


Figure 40 : Les podosomes sont des structures interconnectées par le réseau d'actine.
 (A)(B) Images de microscopie électronique à balayage montrant la membrane ventrale d'ostéoclastes formant des podosomes perpendiculaires au substrat (têtes de flèches). Ces structures apparaissent interconnectées par des filaments d'actines parallèles au substrat. D'après Luxenburg et al., 2007

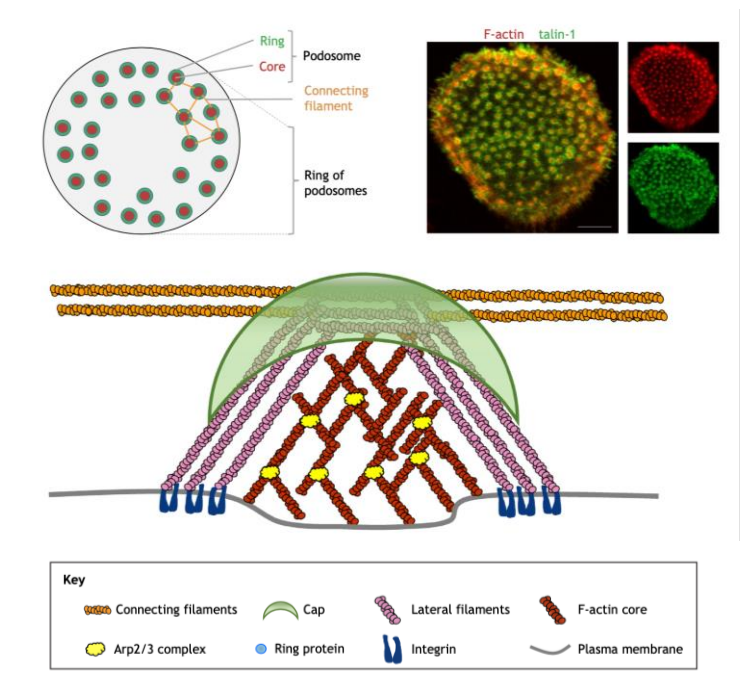


Figure 41 : L'architecture de la coiffe dans l'organisation collective des podosomes.
 D'après van den Dries et al., 2019

Le réseau interconnecté et la coiffe de podosomes. D'abord caractérisés comme des structures isolées, les podosomes peuvent apparaître dans certaines cellules (ostéoclastes, macrophages)^{314,315} comme des éléments de base d'un réseau interconnecté par des câbles d'actine et de myosine^{316,317}. Une étude élégante de microscopie corrélative associant la microscopie électronique à de la microscopie à fluorescence a permis de caractériser finement l'architecture de ces superstructures, avec notamment la présence d'un deuxième jeu de câbles d'actine parallèle au substrat, non ramifiés et contractiles, connectant les podosomes les uns aux autres³¹⁴ (Figure 40). Cette organisation semble essentielle pour assurer le comportement collectif et synchrone des podosomes à plus grande échelle. Par ailleurs, l'analyse fine des réseaux d'actine par la microscopie à haute résolution a révélé l'existence d'un troisième élément d'architecture qui chapeaute la structure, appelé coiffe, contenant notamment les formines FMNL1 et la supervilline^{318,319} (Figure 41). Cette structure pourrait moduler la croissance des podosomes ou contrôler les forces contractiles qui leur sont associées.

4.1.2. Focus sur le cytosquelette des invadosomes

Rôle du cytosquelette au cours des différents stades de maturation des invadosomes. Les invadosomes sont des structures dynamiques dans lesquelles la polymérisation/dépolymérisation de l'actine est continue. La polymérisation a lieu au sein du domaine membranaire ponctiforme de 0.5 à 1 µm de diamètre au niveau de la membrane plasmique de la cellule et le podosome ainsi formé croît perpendiculairement sur une hauteur d'environ 0.6 µm. L'utilisation de la microscopie de force atomique a permis de révéler l'oscillation des protrusions, animées par des fluctuations de forces protrusives générées par l'acto-myosine³¹⁶.

Dans le cas des cellules tumorales, l'équipe de D. Vignjevic a mis en évidence la nature mixte du cytosquelette d'actine des invadopodes intégrant à la fois des caractéristiques de type lamellipode (réseau d'actine dendritique) et de type filopode (réseau d'actine fasciculée et parallèle)³²⁰. Le passage de la lame basale est initié par l'actine fasciculée, avec la fascine comme protéine clef dans cette organisation, permettant d'exercer la force nécessaire au franchissement de cette barrière. Quant au réseau d'actine dendritique, comprenant les protéines α -actinine et Arp2/3, il permet l'élongation des invadopodes en stabilisant leurs architectures. Les auteurs mettent ainsi en évidence l'importance de l'organisation mixte du

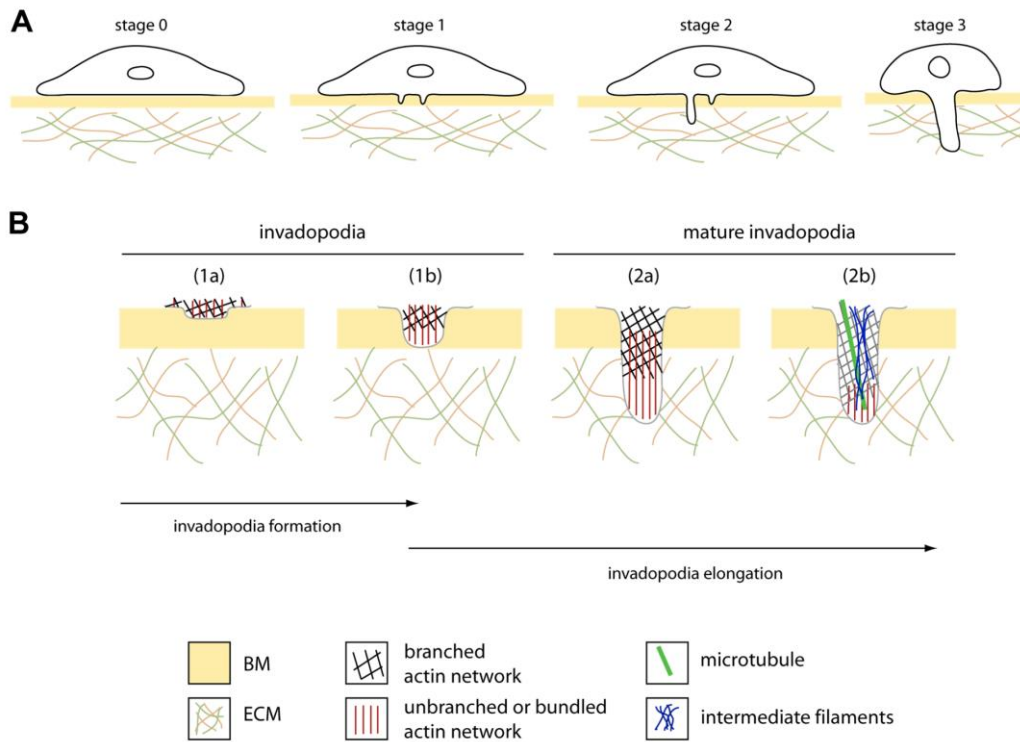


Figure 42 : Modèle de la formation et la maturation des invadopodes.

(A) La cellule tumorale devient invasive (stade 1) et forme des invadopodes dégradant la lame basale (notée BM, en jaune). Ces invadopodes s'allongent (stade 2) et la cellule s'infiltré dans le tissu (stade 3). (B) Maturation et élongation des invadopodes. Un réseau d'actine branché et fasciculé permet l'assemblage de l'invadopode. Puis l'actine fasciculée s'allonge pour former des faisceaux soutenus par le réseau d'actine branchée à la base de l'invadopode. Enfin les microtubules et les filaments intermédiaires s'organisent dans l'invadopode mature et l'actine branchée se développe en remplaçant les faisceaux d'actine. D'après Schoumacher et al., 2010

cytosquelette d'actine des invadosomes leur permettant d'initier et de promouvoir l'invasion des cellules cancéreuses. Par ailleurs, ils démontrent qu'une coopération entre les microtubules et les filaments intermédiaires de vimentine est requise dans l'élongation des invadopodes. Le rôle des microtubules dans la stabilisation des podosomes est en accord avec des observations rapportées sur les ostéoclastes et les macrophages traités au nocodazole, une molécule dépolymérisant les microtubules^{298,321,322} (Figure 42).

Les voies de signalisation contrôlant la formation des podosomes. De nombreux travaux ont démontré l'importance de WASp dans les voies de signalisation associées aux podosomes. WASp a un rôle clef dans l'organisation de la structure d'actine en tant qu'activateur de Arp2/3. En effet, lorsque WASp est en conformation inactive, son domaine d'interaction avec Arp2/3 n'est pas accessible. C'est lorsque Rac ou Cdc42 se lie à WASp qu'il opère un changement de conformation et va ensuite interagir avec le complexe Arp2/3. La nécessité de **la triade intégrines - Src - RhoGTPases** dans la formation des invadosomes est également bien documentée comme des protéines de signalisation majeur dans l'induction des podosomes³²³⁻³²⁶. Un modèle a été décrit par C. Albiges-Rizo *et al.*, faisant mention, en premier lieu, de l'engagement des intégrines et leur regroupement dans des zones enrichies en phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) de la membrane plasmique. Ceci conduit au recrutement de la tyrosine kinase non-récepteur Src et à la phosphorylation de la cortactine, de WASp et de petites GTPases. La nucléation de l'actine est alors possible via le complexe Arp/3 par l'action synergique de la cortactine et de WASp. Enfin, l'allongement des filaments d'actine induit par les formines permet ensuite la formation de colonne perpendiculairement au substrat³²⁷ (Figure 43). Parmi les GTPases impliquées dans l'assemblage de l'actine dans les podosomes, RhoA semble jouer un rôle puisqu'il a été montré que la micro-injection de l'enzyme C3 (une toxine botulique qui inhibe RhoA/B/C) provoquait un désassemblage rapide de la zone de scellement dans les ostéoclastes³²⁸. Par la suite, il a été précisé que RhoA contrôlait le niveau d'acétylation des microtubules et l'organisation de l'actine par le biais de la formine effectrice mDia2, qui régulait à son tour l'histone désacétylase HDAC6, contrôlant ainsi la maturation des podosomes dans les ostéoclastes^{326,329,330} (Figure 44).

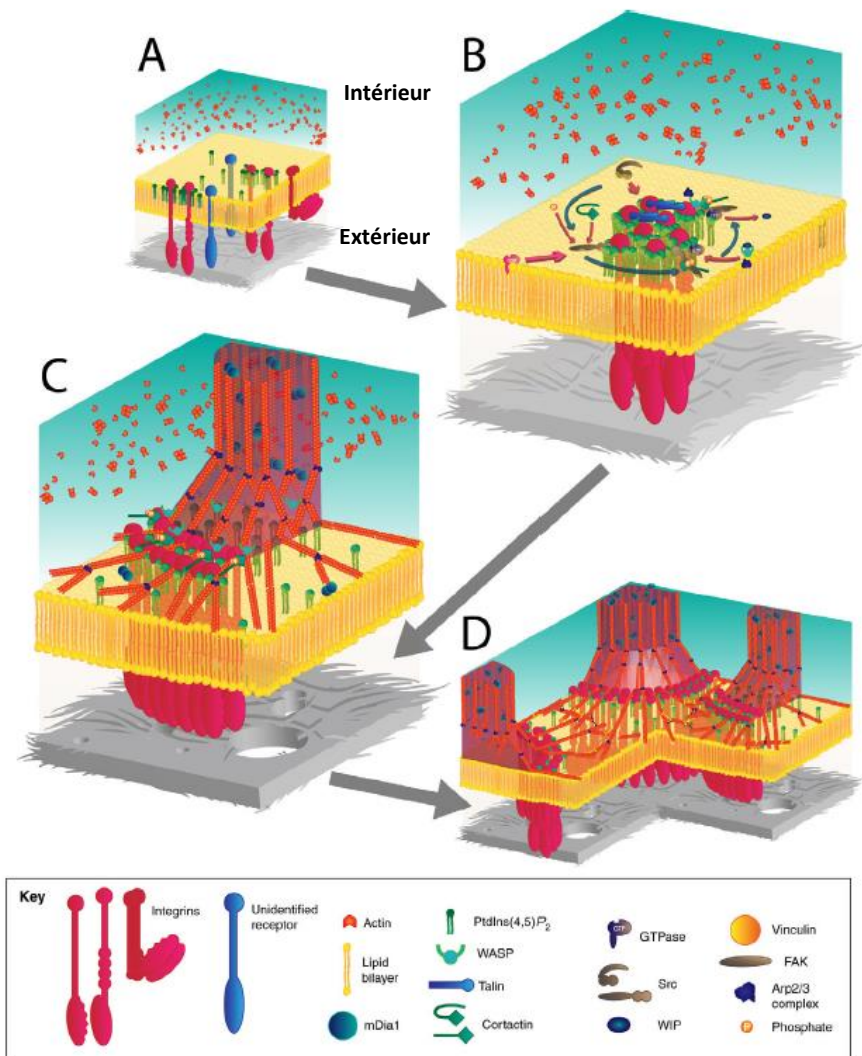


Figure 43 : Modèle de formation des invadosomes.

(A) Les intégrines se lient à la MEC et se regroupent. (B) La signalisation impliquant Src, FAK et les GTPases induit l'activation de WASP et Arp2/3. (C) L'actine monomérique est alors polymérisée en filaments d'actine branchés. L'élongation de ces filaments d'actines conduit à la formation de piliers d'actine au cœur du podosome. (D) Les podosomes s'interconnectent par un réseau d'actine branchée. Adapté, d'après Albiges-Rizo et al, 2009

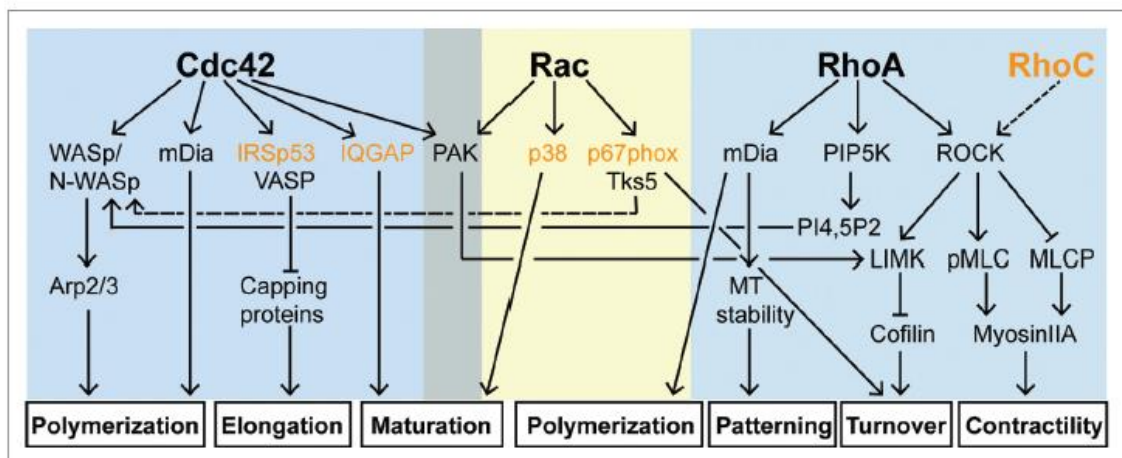


Figure 44 : Effecteurs de la signalisation des invadosomes.

Les GTPases Cdc42, Rac et RhoA contribuent au réarrangement du cytosquelette d'acto-myosine et à la construction des invadosomes. La contribution de chaque voie sous-jacente dépend des types cellulaires étudiés et des mécanismes de coopérations ou d'inhibition existents entre ces différents effecteurs. D'après Spuul et al., 2014.

4.1.3. Régulation de la formation des podosomes.

Régulation par le microenvironnement. Le microenvironnement joue un effet prépondérant dans l'acquisition des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des podosomes. On sait que le contact avec le substrat peut déclencher l'assemblage des podosomes, sans que l'on sache aujourd'hui préciser la nature du signal inducteur. Ce signal peut être d'origine extracellulaire (nature et propriété de la matrice, cytokines, facteurs solubles tel que SDF-1 α , TGF- β , esters de phorbol), mécanique (confinement, rigidité, topologie du substrat) ou résulter de changements intracellulaires (dérivés réactifs de l'oxygène, microARN, etc.) démontrant clairement la complexité de cette régulation³³¹. Les caractéristiques du substrat (composants, géométrie, rigidité) modulent la localisation, l'arrangement ainsi que la durée de vie des podosomes. Par exemple, sur une surface en relief, les podosomes s'accumulent le long des crêtes et sont plus stables que ceux formés dans les zones régulières et planes³³². Les podosomes se maintiennent deux fois plus longtemps sur un substrat rigide (160 sec) que sur un substrat flexible (84 sec)³³³. Sur une matrice de faible rigidité, les podosomes peinent à se former³⁰². Inversement, sur une matrice rigide, leur nombre augmente et leur pouvoir protéolytique est multiplié³³⁴, faisant des podosomes **des modules adhésifs mécano-sensibles**.

Rôle des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ dans la formation des podosomes. De nombreuses études s'accordent à dire que **les intégrines sont des composants cruciaux des podosomes**. Elles sont localisées dans l'anneau des podosomes de nombreuses cellules, comme par exemple les intégrines $\beta 2$ dans les podosomes des macrophages³³⁵, et les intégrines $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$ dans les podosomes des ostéoclastes³³⁶. La délétion des trois intégrines $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$ est nécessaire pour conduire à la disparition totale des podosomes dans les ostéoclastes³³⁷. C'est également dans les ostéoclastes, qu'un rôle particulier a été attribué aux intégrines $\beta 3$. Leur expression est corrélée avec la formation des podosomes et, à l'inverse, leur inactivation conduit à une perte de formation de la ceinture de podosomes *in vitro* et *in situ*^{298,321,338,339}. En ce qui concerne les intégrines $\beta 1$, il a été rapporté que c'était l'oscillation dynamique entre leur état actif /inactif, plutôt que la configuration constitutivement active, qui jouait un rôle essentiel dans la fonction des invadosomes³⁴⁰. En effet, l'utilisation d'un agent d'inactivation photoinductible (KillerRed) des intégrines $\beta 1$ a permis de mettre en lumière le rôle stabilisateur de l'intégrine dans les invadosomes. Enfin, il a été montré que les intégrines

avaient un lien étroit avec la métalloprotéase MT1-MMP (également appelée MMP-14) dans des cellules endothéliales au cours de leur migration. L'engagement et le regroupement des intégrines $\beta 1$ sur les cellules endothéliales par le collagène de type I induit une interaction physique entre MT1-MMP et les intégrines $\beta 1$, conduisant à l'activité protéolytique de la MT1-MMP à la surface des cellules endothéliales³⁴¹.

4.2. Tour d'horizon sur les fonctions des invadosomes

Pour mieux se rendre compte du rôle que les podosomes pourraient jouer dans la transmigration des MKs, les données exposées ici concernent les fonctions classiquement attribuées aux invadosomes.

4.2.1. Adhérence et dégradation de la matrice extracellulaire

Le couplage antagoniste « adhérence-dégradation ». Une des singularités des invadosomes est leur couplage entre les machineries d'adhérence de l'actine et de dégradation des matrices, encore appelé **ADC (pour « *acto-adhesion and degradation coupling* »)**. Ces deux fonctions ne sont pas automatiquement liées mais semblent être finement régulées pour contrôler les fonctions des podosomes et mieux contrôler leur dynamique³⁴². L'activité protéolytique dépend de la libération polarisée des métalloprotéases MT1-MMP (décrite dans le paragraphe ci-dessous) qui est elle-même liée à la machinerie adhésive et au cytosquelette d'actine. Plusieurs composants cellulaires impliqués dans l'organisation du cytosquelette, et dans la régulation du trafic de MT1-MMP et de son ciblage polarisé vers les invadopodes, ont été décrits dans la littérature. Parmi les candidats possibles, on peut citer les membres de la famille ARF-GTPase, les protéines adaptatrices Tks5 et Tks4 liées à la signalisation des Src, et les protéines impliquées dans le transport le long des microtubules de la famille des kinésines³⁴³⁻³⁴⁵. Plus récemment, Vellino et collaborateurs ont mis en évidence l'importance de la signalisation calcique, et en particulier du canal calcique TRPV4, pour réguler le couplage ADC. Dans cette étude, les auteurs montrent que ce sont les espèces réactives de l'oxygène qui, en se liant au canal calcique TRPV4, régulent négativement l'activation des intégrines $\beta 1$ et contrôlent ainsi négativement les fonctions d'adhérence et de dégradation des invadosomes³³¹.

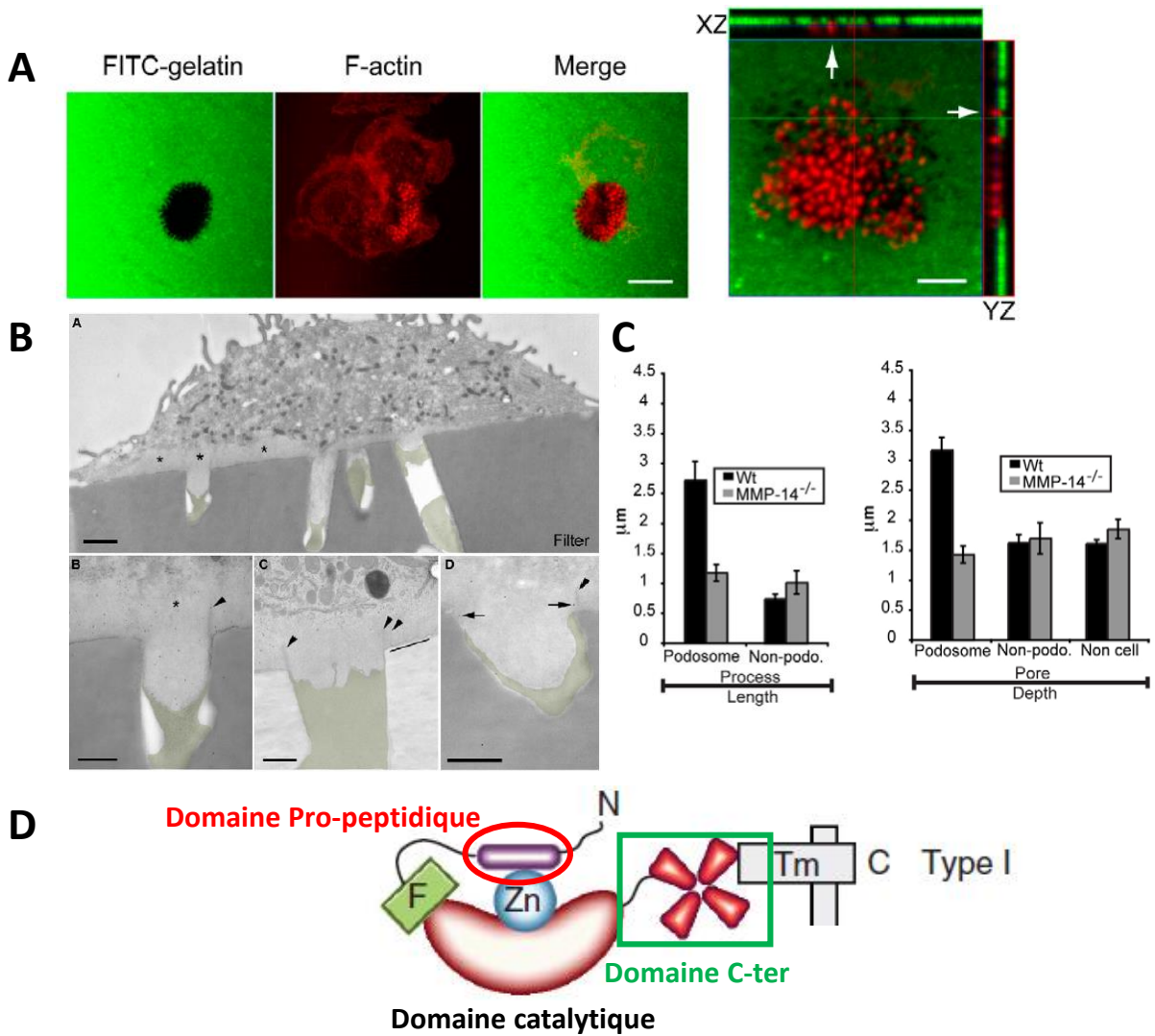


Figure 45 : L'activité de dégradation de matrice et d'invasion des invadosomes est MT1-MMP dépendante.

(A) Podosomes (Actine-F en rouge) de cellules dendritiques dégradant une matrice de gélatine-FITC (en vert) avec la présence d'une zone sombre de dégradation. D'après West et al., 2008. (B)(C) Podosomes de cellules dendritiques envahissant un filtre imprégné de gélatine. La longueur de la protrusion et la taille des pores formés sont réduits en absence de MT1-MMP (notée MMP-14). D'après Gawden-Bone et al., 2010. (D) Structure de la MT1-MMP. Adapté, d'après Okada et al., 2017.

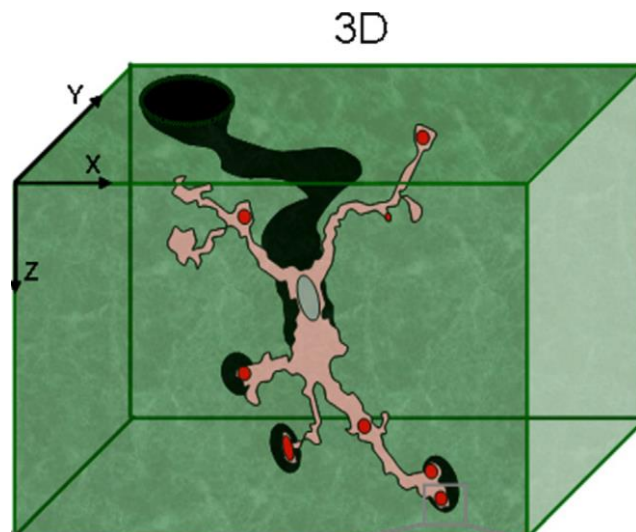


Figure 46 : Invasion des podosomes de macrophages au travers d'un gel 3D de collagène.
D'après Van Goethem et al., 2011

Les métalloprotéases et la MT1-MMP. Les MMPs sont des endopeptidases dont l'activité dépend de la présence d'un ion métallique de zinc Zn^{2+} au niveau de leur site catalytique. Elles sont synthétisées sous forme de proenzyme inactive nommée zymogène. Chez l'Homme et la souris, il existe 23 métalloprotéases³⁴⁶ qui partagent entre elles une structure commune comprenant : un domaine pro-peptidique qui maintient l'enzyme sous forme inactive, un domaine catalytique et une région charnière assurant la liaison entre le domaine catalytique et la partie C-terminal^{347,348}. La spécificité de substrat est régie par le domaine C-terminal (Figure 45).

Parmi les différentes MMPs, la **MT1-MMP** (également appelée MMP-14) occupe une place particulière dans la fonction de dégradation des invadosomes. En effet, son inhibition conduit à une diminution de dégradation de la matrice, ainsi qu'à une réduction de la taille des protrusions émises et de la largeur des pores formés au travers de la matrice^{302,349}. La MT1-MMP a ainsi été décrite comme essentielle à l'invasion cellulaire en conditions tumorales et à la progression métastatique³⁵⁰⁻³⁵³. De plus, cette enzyme favorise la génération de forces protrusives et est impliquée dans l'assemblage des invadopodes puisque son absence réduit de plus de moitié la proportion de cellules formant des invadopodes³⁵⁴. La MT1-MMP est délivrée par le réseau de microtubules et est exposée à la membrane plasmique en contact avec la MEC sur laquelle elle exerce son activité enzymatique³⁵⁵.

L'activité enzymatique des podosomes permet aux macrophages de creuser des tunnels. En immobilisant la cellule et en concentrant les activités enzymatiques portées par les métalloprotéases, les podosomes représentent un dispositif cellulaire efficace destiné à former un chemin sous la cellule pour libérer un espace dans lequel celle-ci s'introduit. Ceci a été particulièrement bien décrit pour les ostéoclastes et les macrophages. Par exemple, l'équipe de V. Cabec a cultivé des macrophages dans un gel 3D de collagène I, mimant l'environnement des macrophages dans les tissus *in vivo*³⁰⁸. Les auteurs ont démontré l'existence de structures podosomales 3D situées aux extrémités de longues protrusions membranaires émises par les macrophages au cours de leur migration mésenchymateuse. Ces podosomes 3D présentent une forte activité de dégradation liée à la MT1-MMP permettant de dégrader, d'ingérer et de compacter la matrice (Figure 46). La question se pose alors de savoir si les MMPs sont impliquées dans le passage de la lame basale par les MKs et ceci sera abordé dans l'axe 3 de ma thèse.

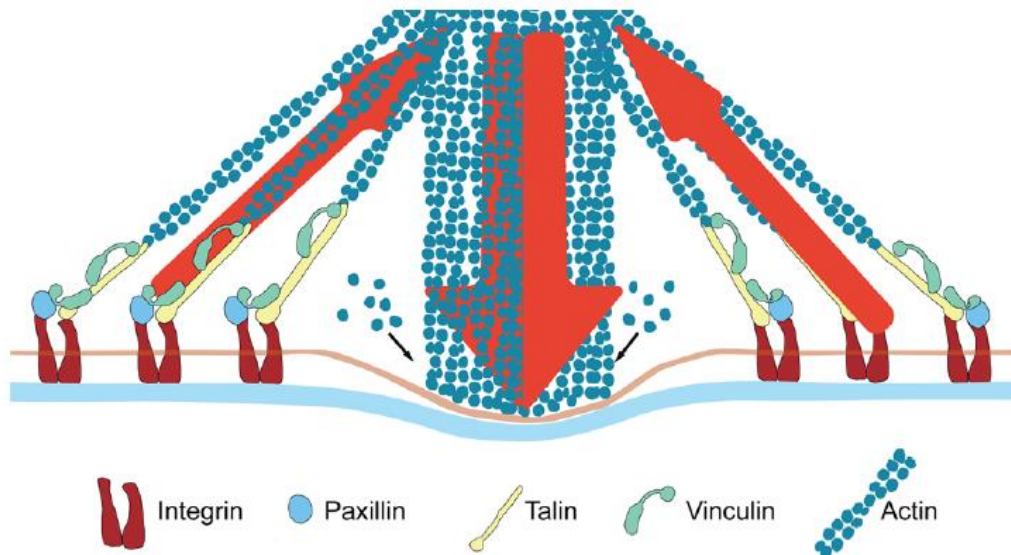


Figure 47 : Organisation des protéines et génération de la force du podosome.

Au cœur du podosome, l'actine forme un pilier qui polymérise contre le substrat. Il est entouré d'un complexe d'adhérence en forme d'anneau qui est basé sur les intégrines. La poussée centrale du podosome induite par la polymérisation de l'actine s'équilibre avec la traction au niveau l'anneau d'adhérence, permettant ainsi d'appliquer une force protrusive déformant le substrat. D'après Bouissou et al., 2017.

4.2.2. Remodelage de la matrice par la force du cytosquelette d'actine

Le remodelage de la lame basale par les podosomes n'est pas uniquement un processus enzymatique. Il peut s'accompagner ou être **remplacé par une génération de force et un déplacement des protéines de matrice extracellulaire.**

Le podosome est un générateur de force. L'équipe d'Isabelle Maridonneau-Parini à Toulouse a récemment précisé l'architecture nanométrique et le fonctionnement mécanique de ces structures. En couplant la microscopie 3D à l'échelle nanoscopique et la microscopie de force atomique, ces chercheurs ont démontré que le podosome est un générateur autonome de force où sont couplées une force de protrusion et une force de traction³¹⁶. Selon leur hypothèse, les forces de protrusion doivent être contrebalancées par des forces de traction pour que le podosome puisse déformer l'environnement localement. Dans le but d'étudier la fonction mécanique de l'anneau d'adhérence, l'expression de plusieurs de ses composants a été inhibée et l'effet sur la capacité protrusive des podosomes a été déterminée par microscopie à force atomique. Cette approche a mis en évidence que l'intégrité de l'anneau d'adhérence est cruciale pour qu'une force protrusive soit générée au cœur du podosome. L'anneau fonctionnerait donc comme un appui qui transmettrait à l'environnement la force produite au cœur d'actine protrusif du podosome³⁵⁶ (Figure 47). A l'aide d'une technique de nanoscopie tridimensionnelle appelée DONALD (*Direct Optical Nanoscopy with Axially Localized Detection*), les chercheurs ont révélé que la taline, un des constituants de l'anneau, est étirée verticalement au sein d'un échafaudage moléculaire qui fait le lien entre les récepteurs d'adhérence et le cytosquelette et qui contient la vinculine et la paxilline³⁵⁶. L'étirement de la taline s'accroît lorsque le podosome génère des forces protrusives importantes, ce qui prouve que l'anneau subit une tension mécanique. En accord avec ces études, une méthode consistant à déposer des lymphocytes T sur micropiliers de PDMS a été appliquée à l'analyse en immunofluorescence de la formation des podosomes en 3D ainsi que déduire les forces de traction générées par les podosomes en suivant le déplacement des piliers³⁵⁷. La question qui se pose encore est : Qu'en est-il de ces mécanismes *in vivo* ?

Combiner dégradation et force. Le remodelage de la lame basale peut faire intervenir la dégradation enzymatique **et** la génération de force par les podosomes. Sur un modèle d'*anchor cells* de *C. elegans*, Kelley *et al.*, a révélé que le passage de la lame basale s'accompagne d'une dégradation enzymatique pouvant être substituée par une génération

A

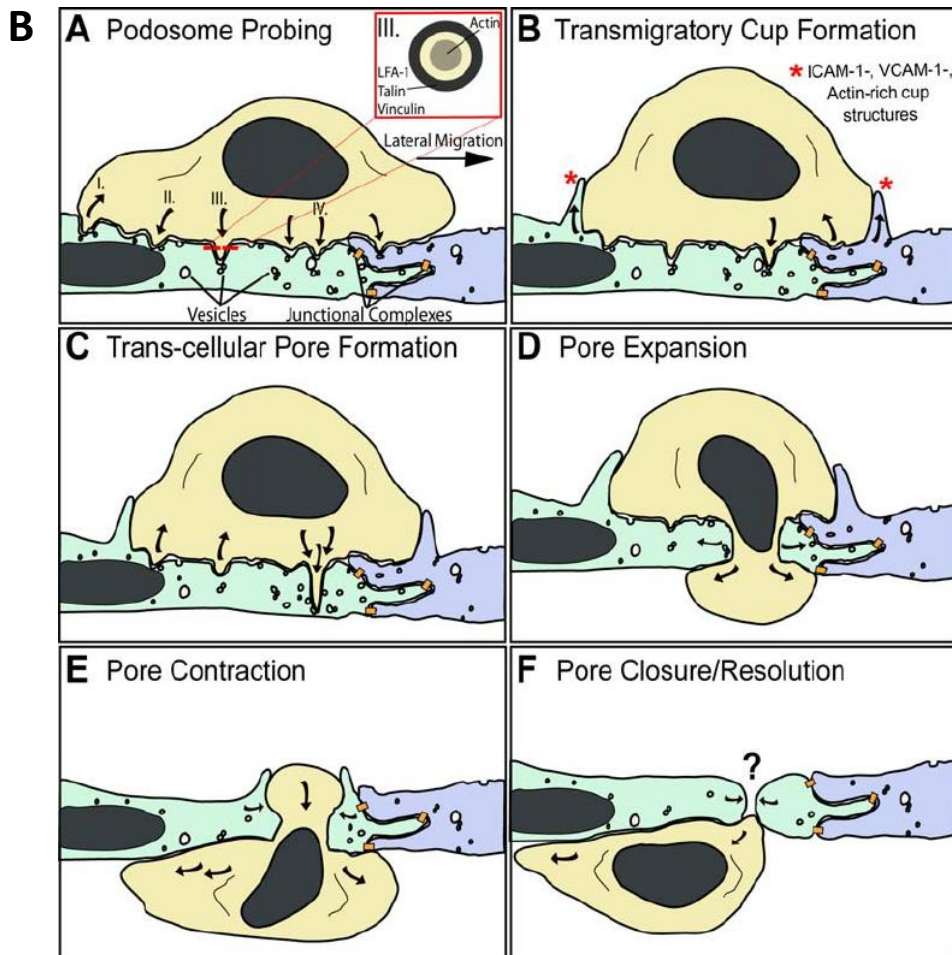
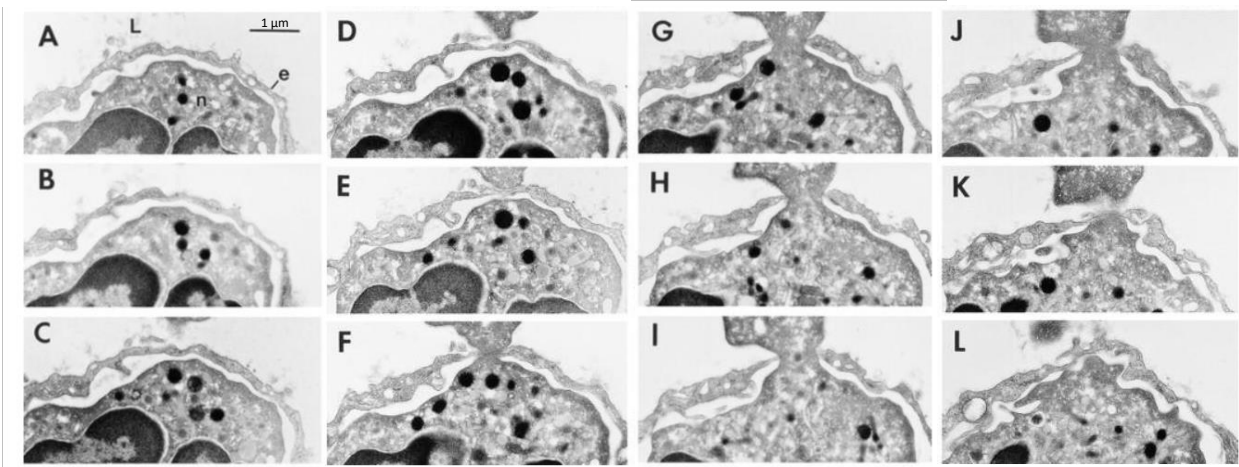


Figure 48 : Le passage de la barrière endothéliale.

(A) Coupe sériées montrant un neutrophile pénétrer l'endothélium et former un pore transendothélial (f-j). Adapté, d'après Feng et al., 1998. (B) La diapédèse transendothéliale. D'après Sage et Carman, 2009.

de force conduisant à un déplacement des protéines de matrice extracellulaires à la périphérie. Les *anchor cells* des vers déficients en MT1-MMP arrivent ainsi à perforer la lame basale en recrutant d'avantage de mitochondries, source d'ATP, au site protrusif afin d'augmenter la force générée. L'activité de dégradation initierait la formation de pores et la génération de force jouerait un rôle d'accélérateur du franchissement de la lame basale³⁵⁸.

4.2.3. L'invasion cellulaire

Pour souligner d'éventuel points communs avec les MKs, nous mentionnons dans cette partie les études décrivant des processus d'invasion cellulaire liés aux invadosomes.

L'exemple des leucocytes. Les deux exemples les plus connus sont ceux rapporté par D. Feng²²⁴ et C. Carman²¹⁴ qui ont montré que les leucocytes développaient des protrusions membranaires pour emprunter un passage transendothélial. L'étude de D. Feng *et al.*, est basée sur l'observation de coupes consécutives par microscopie électronique à transmission (Figure 48A). Son étude repose sur un modèle d'inflammation aiguë dans lequel l'interaction *in situ* de neutrophiles avec des microvaisseaux de la peau a été étudiée après injection intradermique de fMLP (N-formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine), un peptide chimiotactique attirant neutrophiles et leucocytes, à des cochons d'Inde. L'analyse de coupes sériées a permis de montrer que les neutrophiles étendaient **de courtes extensions directement au travers des cellules endothéliales**, sans lien avec les jonctions inter-cellulaires, permettant à D. Feng et ses collaborateurs de conclure à un parcours cellulaire entièrement transendothélial. L'étude de C. Carman, quant à elle, est basée sur des approches d'imagerie dynamique par fluorescence et de l'ultrastructure. Les auteurs démontrent que les lymphocytes se servent de protrusions invasives pour palper la surface de l'endothélium et former des pores transcellulaires. Ils montrent que ces structures sont très dynamiques avec des phases de protrusion/rétraction rapides qui pourraient permettre aux cellules de scanner la surface de l'endothélium afin d'y trouver des zones de moindre résistance avant de traverser la matrice extracellulaire puis la barrière endothéliale. Sur la base de leur architecture, de leur dynamique et de leur signalisation médiée par WASp et la kinase Src, les auteurs concluent que ces protubérances représentent **des "podosomes invasifs"**. Ils peuvent être formés par des lymphocytes, des monocytes et des basophiles et sont observés *in vitro* et *in vivo*. Ils ont également constaté que des événements de fusion membranaire dépendant des protéines SNARE étaient nécessaires pour la formation efficace de pores transcellulaires

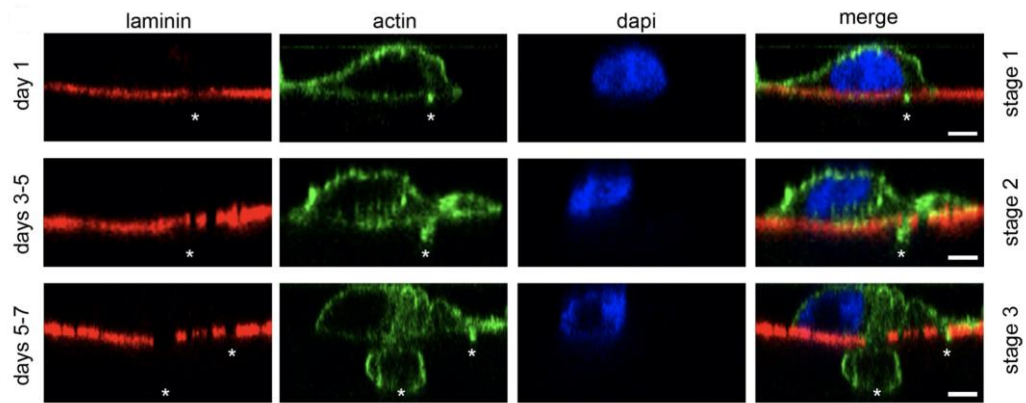


Figure 49 : Invasion d'une lame basale mésothéliale par des cellules tumorales.

La cellule forme une courte protrusion invadopodiale qui dégrade la matrice (jour 1). L'invadopode s'allonge au travers de la lame basale mésothéliale (jour 3-5) puis la cellule s'infiltré au travers de la lame basale (jour 5-7). D'après Schoumacher et al., 2010

dans l'endothélium (Figure 48B). Ces deux études démontrent **le rôle fonctionnel des podosomes dans le passage transendothélial des cellules.**

L'exemple des cellules cancéreuses. Dans le cas des cellules tumorales, la progression métastatique se met en place lorsque des cellules d'une tumeur primaire quittent leur stroma, dégradent la lame basale, traversent la paroi vasculaire, pénètrent dans la circulation sanguine avant d'extravaser vers un site secondaire. Elle nécessite l'acquisition de propriétés migratoires et invasives par les cellules cancéreuses, avec un remodelage de leur cytosquelette d'actine. Les invadopodes jouent un rôle important dans ce contexte en accordant aux cellules tumorales des capacités uniques d'invasion et de dégradation de la MEC. Pour comprendre le déroulement de ces événements, l'équipe de D. Vignejevic a développé des modèles *in vitro* utilisant : 1) la membrane péritonéale qui mime l'architecture d'une membrane basale native et permet ainsi d'analyser les premières étapes d'initiation et d'interaction des invadopodes avec son substrat et 2) un modèle d'insert dont les pores sont remplis de matrigel permettant d'examiner comment les invadopodes pénètrent et s'étendent dans le substrat³²⁰. Les auteurs ont ainsi pu décrire que les cellules cancéreuses traversent la lame basale selon trois phases de développement des invadopodes : 1) l'initiation de courtes protrusions capables de dégrader la lame basale, 2) l'élongation et maturation des protrusions puis 3) le guidage et le passage du corps cellulaire au travers de la lame basale. L'ensemble de ce processus s'étend sur 5 jours et exige une organisation mixte du cytosquelette (Cf paragraphe 4.1.2). De façon intéressante, cette étude démontre la nécessité **d'un processus de maturation des podosomes** pour le passage de la lame basale (Figure 49). Cette capacité d'invasion de la matrice permet aux cellules cancéreuses d'entrer dans la circulation générale et d'envahir différents tissus. Par conséquent, la caractérisation des invadopodes des cellules cancéreuses est actuellement un domaine de recherche important pour identifier des cibles thérapeutiques potentielles.

L'exemple des macrophages. Un troisième exemple vient des macrophages M2, intervenant dans la réparation des tissus et qui sont associés à la phase tardive des réponses immunitaires. Pour remplir leur fonction, ces cellules doivent traverser la barrière endothéliale et la lame basale pour atteindre les tissus. Des modèles *in vitro* de monocouches de cellules endothéliales reposant sur de la matrice extracellulaire ont été utilisés pour caractériser l'organisation et la dynamique de leurs podosomes. Il a ainsi pu être montré que, suite à une stimulation par la chimiokine CSF1, les podosomes des macrophages s'accumulaient au front

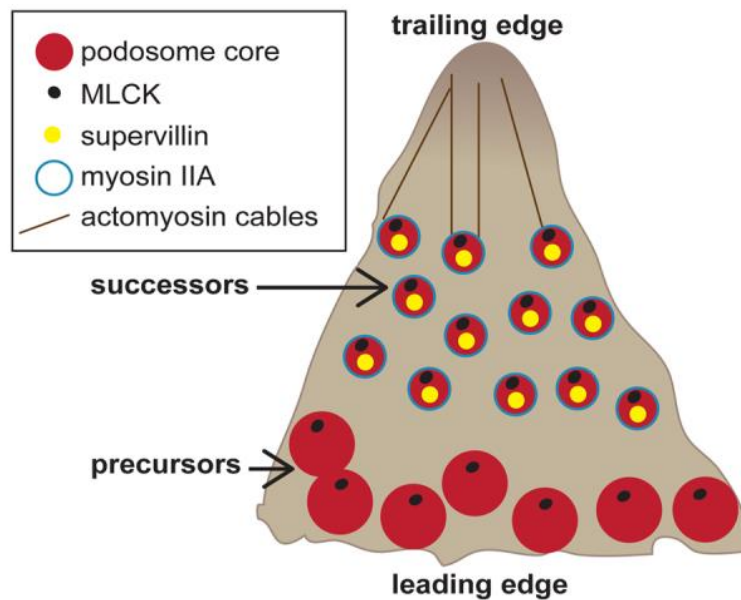


Figure 50 : Les podosomes précurseurs et successeurs.

Un macrophage polarisé présente des précurseurs plus grands sur le bord d'attaque (en bas) et des successeurs plus petits sur le bord de fuite (en haut). Seuls les successeurs contiennent de la myosine IIA et sont connectés aux câbles d'actomyosine. Adapté d'après Bhuwania et al., 2012.

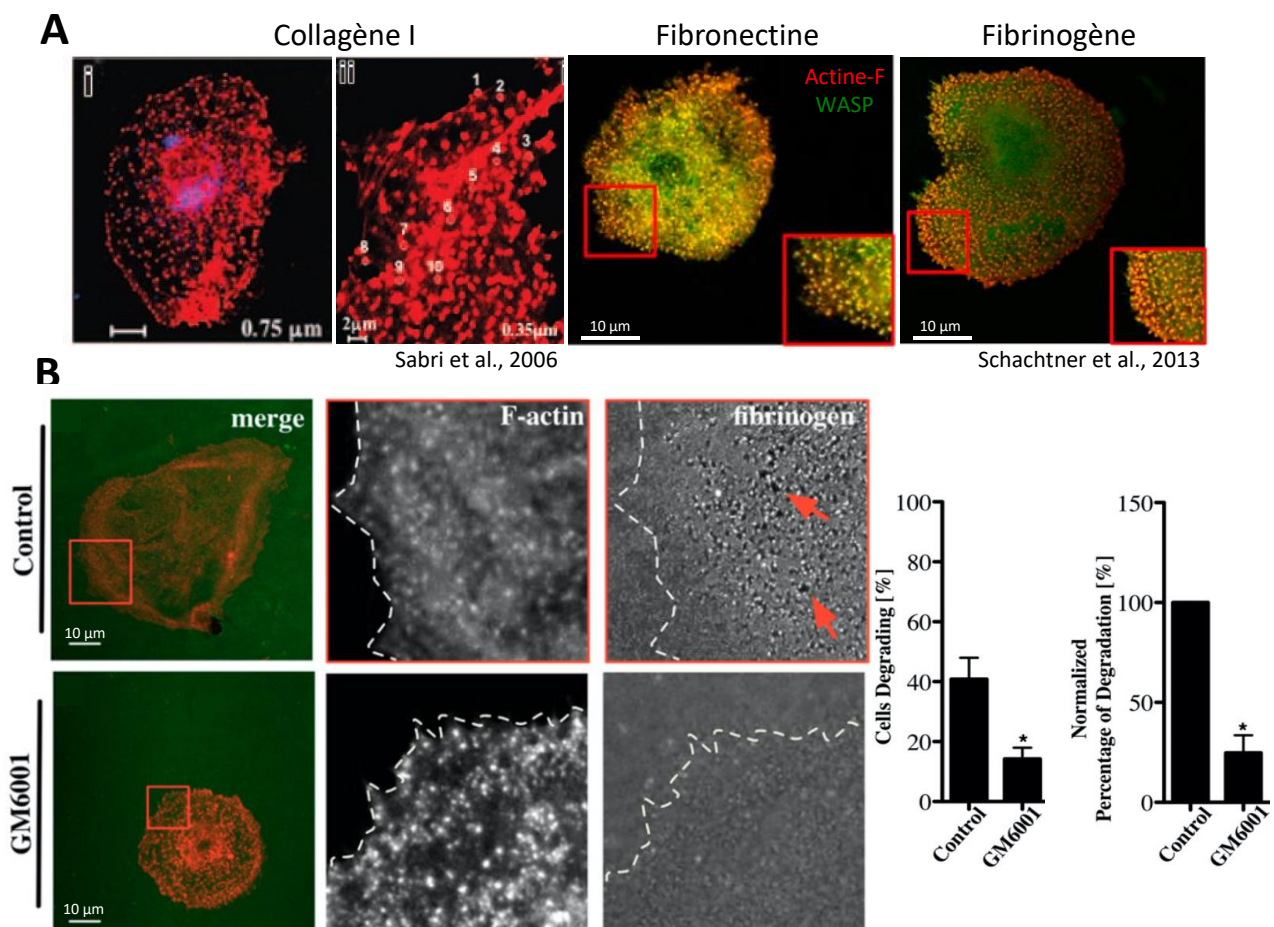


Figure 51 : Les mégacaryocytes forment des podosomes *in vitro* capables de dégradation.

(A) MKs murins issus de culture lin – formant des podosomes (actine-F, en rouge) sur du collagène, de la fibronectine et du fibrinogène. Adapté, d'après Sabri et al., 2006 et Schachtner et al., 2013. (B) En condition contrôle, les MKs murins issus de cultures lin - forment des podosomes (actine-F, en rouge) qui dégradent la matrice de fibrinogène fluorescent (ponctuations noires). L'inhibition de MMPs au GM6001 réduit la dégradation de la matrice par les MKs. Adapté, d'après Schachtner et al., 2013.

de migration, et s'assemblaient/se déformaient continuellement de façon très rapide²⁹⁷. Cette dynamique élevée des podosomes permet aux macrophages de se déplacer plus rapidement et ainsi de traverser une monocouche de cellules endothéliales. La caractéristique la plus remarquable de ces cellules est qu'elles possèdent deux populations de podosomes : (1) les « précurseurs », de grandes tailles et dynamique, localisés au front de migration et (2) les « successeurs », plus petits et plus stables, connectés à des câbles d'actomyosine et localisées en arrière des premiers³¹⁹ (Figure 50). Cette organisation particulière serait dépendante de la protéine supervilline présente dans la coiffe des successeurs, qui serait essentielle à la capacité des macrophages à traverser une barrière en 2D³¹⁹. Cette étude révèle **qu'au sein d'une même cellule les podosomes ne sont pas tous équivalents** et qu'il existerait une **spécialisation associée à des fonctions particulières**.

4.3. Les mégacaryocytes forment des podosomes *in vitro*

4.3.1. Les podosomes des mégacaryocytes

Caractérisation des podosomes mégacaryocytaires. Les podosomes des MKs ont été décrits *in vitro*, en 2D et en l'absence d'une matrice complexe que sont le milieu interstitiel ou la lame basale. Des études *in vitro* indiquent que les MKs sont capables d'adhérer et de former des podosomes sur des protéines matricielles (de type collagène I, fibronectine, matrigel)^{104,140}. La matrice module la durée de vie des podosomes : ceux formés par les MKs sur le collagène I perdurent trois fois plus longtemps que ceux formés sur le fibrinogène. Ces protrusions ont été caractérisées *in vitro* comme étant des podosomes sur la base de leur composition moléculaire consistant en un cœur d'actine et de protéines associées à sa polymérisation telles que WASp et le complexe Arp2/3, encerclé d'un anneau constitué de protéines structurales telles que la vinculine, la cortactine ou la taline (Figure 51A)^{104,140}. Par ailleurs, l'utilisation de souris déficientes en WASp (WASp⁻) a permis à l'équipe de W. Vainchencker de montrer un défaut de formation de podosomes sur une matrice de collagène I et une diminution de leur capacité de migrer vers un gradient de SDF-1 suggérant un rôle de ces structures dans l'attachement au sous-endothélium¹⁰⁴. La myosine IIA ne semble pas contribuer de façon significative à la formation de ces structures *in vitro* puisque l'inhibition de son activité par la blebbistatine ne modifie ni le nombre des podosomes/MK, ni l'étalement des cellules sur le collagène. Il est intéressant de noter que l'observation de **la moelle des**

souris WASp⁻ révèle une libération ectopique des plaquettes dans le compartiment médullaire. Ces résultats suggèrent ainsi le rôle central des podosomes dans la mégacaryopoïèse et fournissent un mécanisme pouvant expliquer la thrombopénie modérée observée chez les souris WASp⁻ (527 000 plaquettes/ μ L)³⁵⁹. En outre, ils apportent de nouvelles réponses quant à l'origine de la microthrombopénie chez les patients souffrant du syndrome de Wiskott-Aldrich dont la protéine WASp n'est pas fonctionnelle (cf 4.3.2.).

Les podosomes des MKs ayant été jusqu'ici principalement décrits *in vitro* et du fait du rôle prépondérant du microenvironnement dans l'acquisition de leurs caractéristique, **l'objectif est donc maintenant de préciser leurs organisations en 3D dans le contexte de la moelle osseuse et de définir leur(s) fonction(s) *in vivo*, en rapport avec le contexte cellulaire de la moelle osseuse.** De façon intéressante, des structures ressemblants à des podosomes ont également été identifiées sur les plaquettes, et joueraient un rôle lors des étapes précoces d'adhérence et dans la formation d'agrégats stables en conditions de flux^{360,361}. Ce point sera discuté dans les perspectives de la thèse.

In vitro les podosomes des MKs sont dotés d'une activité de dégradation de la matrice. En 1990, Leven et Yee montrent que des MKs issus de moelle de cobaye sécrètent deux types de collagénases lorsqu'ils sont mis en culture dans des gels de collagène ou du matrigel. Depuis, plusieurs études transcriptomiques sur des MKs humains en culture issus de cellules CD34⁺ indiquent la présence d'ARNm des formes solubles de MMP-1, -2, -9 et les formes membranaires MMP-14, -17³⁶²⁻³⁶⁴. Les études de colocalisation par immunofluorescence indiquent que les MMP-1, -2, -3, -9 sont localisés dans les granules α avec le vWF et la P-sélectine^{10,365}.

Dans un modèle de Transwell recouvert de matrigel, l'addition d'un anticorps bloquant dirigé contre la MMP-9 réduit significativement le nombre de MKs ayant transmigré, suggérant un rôle de cette MMP dans le passage de la lame basale des MKs. Par ailleurs, l'injection d'un inhibiteur à large spectre de métalloprotéases à une souris empêche l'augmentation de la numération plaquettaire induite par le SDF-1, suggérant un rôle *in vivo* des métalloprotéases dans la production des plaquettes⁸⁸. Enfin, plus récemment, Schachtner et collaborateurs ont démontré la capacité des podosomes de MKs à dégrader le fibrinogène fluorescent de façon MMP et Myosine IIA dépendante¹⁴⁰ (Figure 51B). En effet, lorsque les MKs sont déposés sur une lamelle de verre recouverte de fibrinogène-Alexa488, ils notent la présence de zones non fluorescentes sous les podosomes, témoignant d'une activité de dégradation enzymatique. En

présence de GM6001 ou de blebbistatine, inhibiteurs respectifs des MMPs et de la myosine IIA, le nombre de MKs dégradant la matrice fluorescente et la tailles des zones de protéolyse sont fortement diminués. Ces auteurs proposent que **la production de métalloprotéases liée aux podosomes pourrait constituer une étape importante dans la transmigration des MKs**. A l'heure actuelle, plusieurs travaux et revues proposent l'hypothèse que l'activité de dégradation des podosomes est essentielle à la transmigration des MKs, bien que cela n'ait pas été vérifié *in vivo*. Les anomalies de la formation des podosomes des MKs ont été associées à divers acteurs liés à l'organisation du cytosquelette d'actomyosine. Il s'agit de la protéine WASp^{104,140}, du complexe Arp2/3³⁶⁶, de la protéine adaptatrice ADAP favorisant la dégranulation³⁶⁷, de la L-Plastin³⁶⁸, de la tropomoduline 3¹⁴⁶, la protéine kinase-1 dépendante des phosphoinositides³⁶⁹ et Cdc42¹⁴⁸.

4.3.2. Déficiets touchant un élément de signalisation commun aux podosomes

De nombreuses preuves indirectes suggèrent que les podosomes sont des structures importantes sur le plan physiologique. Par exemple, l'identification de WASp et des protéines apparentées WIP a permis d'établir un lien entre certaines maladies et la polymérisation de l'actine dans les podosomes.

Le syndrome de Wiskott-Aldrich. Ce syndrome est une maladie très rare liée au chromosome X et qui résulte de la mutation mono- ou bi-allélique du gène WAS, affectant ainsi la protéine WASp³⁷⁰⁻³⁷². Plus de 300 mutations ont été décrites à ce jour et aboutissent à une protéine tronquée, absente ou non fonctionnelle, et entraînent un syndrome sévère caractérisé par une thrombopénie associée à une apparition progressive de déficits immunitaires et d'eczéma, et chez certains patients à des réactions auto-immunes³⁷³. La protéine **WASp est exprimée exclusivement dans les cellules hématopoïétiques** et joue un rôle clé dans la régulation du cytosquelette. Son absence entraîne **une microthrombopénie sévère** (moins de 10% de la numération plaquettaire normale) associée à des manifestations hémorragiques et immunitaires graves. Le nombre de MKs médullaires est normal écartant l'hypothèse d'un défaut de production. *In vitro*, les MKs différenciés à partir de cellules CD34+ de ces patients présentent une morphologie normale et une capacité à émettre des proplaquettes normale. Un modèle murin de *knock-in* a permis de montrer le rôle critique de la phosphorylation au site Y293 dans l'activation de WASp, notamment dans l'assemblage des podosomes. Les traitements combinent administration d'immunoglobulines et antibiothérapie pour atténuer

les infections récurrentes de ces enfants. En cas d'hémorragies ou d'interventions chirurgicales, des concentrés plaquettaires sont transfusés. De façon ponctuelle, il est possible d'administrer à ces patients des analogues de la TPO tels que l'elthrombopag afin de stimuler la thrombopoïèse. Néanmoins, la mutation de WASp étant associées à une libération de plaquettes prématurément en intramédullaire, cette approche thérapeutique est limitée, permettant seulement d'augmenter ponctuellement la numération jusqu'à 70 000 plaquettes/ μL ^{372,374}. Les seules solutions curatives sont la greffe de cellules souches hématopoïétiques ou la thérapie génique chez le jeune enfant afin de restaurer une hématopoïèse normale³⁷⁰.

Mutations des protéines du complexe Arp2/3. Ces dernières années, un nouveau déficit génétique touchant le complexe Arp2/3 a été identifiée chez l'Homme. Plusieurs patients ont été décrits présentant des problèmes immunologiques et des saignements dus à une thrombopénie³⁷⁵⁻³⁷⁸. Ces rapports d'études cliniques valident l'importance de cet axe WASp/Arp2/3, et de façon plus spécifique, des podosomes dans la mégacaryopoïèse et la production plaquettaire.

En résumé, l'ensemble de cette revue bibliographie, centrée sur la transmigration des MKs, le rôle potentiel des intégrines et de façon plus générale des podosomes, donne la vision actuelle que l'on peut avoir de la biogénèse des plaquettes sanguines. Elle est en faveur de l'hypothèse selon laquelle les podosomes pourraient jouer un rôle de premier plan au cours du passage des MKs au travers de la paroi des sinusoides de la moelle osseuse.

Objectifs de la thèse

Ainsi, nous venons de voir que les dernières étapes de la mégacaryopoïèse représentent des événements clés dans le bon déroulement de la production plaquettaire, et un défaut ou une modification dans l'une de ces étapes pourrait avoir un effet délétère. A ce jour, la compréhension des mécanismes de formation des plaquettes repose essentiellement sur des études *in vitro* et une connaissance plus précise des processus intervenant *in vivo* est nécessaire.

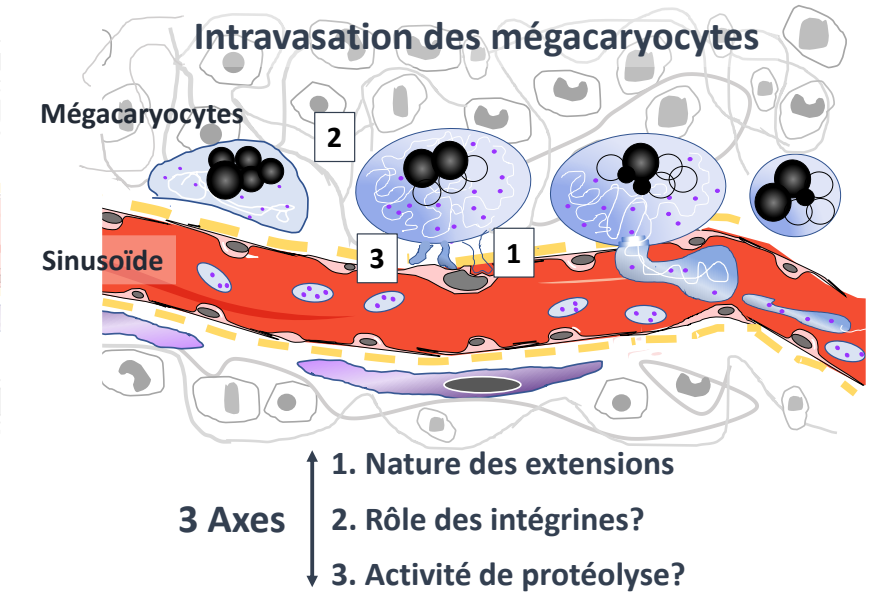
Objectif de la thèse. Mon projet de thèse porte sur le passage des fragments mégacaryocytaires au travers de deux barrières, l'endothélium et la lame basale composant les sinusoides médullaires. Le but de la thèse est de **caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'intravasation des MKs**. Ce travail s'articule autour de trois axes :

Axe 1. Comprendre la nature des extensions émises par les MKs, en particulier l'organisation de leur cytosquelette. Les observations réalisées avant mon arrivée révèlent que les MKs au contact des sinusoides forment des extensions membranaires ressemblant aux podosomes. Afin de comprendre la nature de ces extensions, j'ai analysé leur composition et l'organisation de leur cytosquelette en analysant des cryosections de moelle par microscopie superrésolutive à illumination structurée (SIM) en collaboration avec F. Gaits-Iacovoni (INSERM U1048, I2MC, Université Paul Sabatier, Toulouse, France) et par microscopie corrélative permettant de superposer des images fluorescentes et électroniques.

Axe 2. Évaluer le rôle des intégrines dans le passage des MKs au travers l'endothélium. Nous avons ensuite focalisé notre attention sur les intégrines parce qu'elles permettent l'adhésion des cellules à leur environnement, s'associent aux filaments d'actine pour stimuler leur polymérisation et participent à la formation des podosomes. Ce travail, débuté lors de mon Master 2, a fait appel à des souris déficientes en intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ (notée DKO *Itgb1*^{-/-}/*Itgb3*^{-/-}) car ces intégrines sont les seules exprimées par les MKs.

Axe 3. Déterminer si une activité de dégradation de la matrice extracellulaire est nécessaire au passage trans-endothélial des MKs. Nos observations en microscopie électronique indiquent l'existence d'espaces exempts de protéines matricielles dans la lame basale des sinusoides. La taille de ces ouvertures est suffisante pour le passage des podosomes, mais trop étroite pour celui des proplaquettes, suggérant l'existence d'un mécanisme pour élargir ces ouvertures. Nous formulons ainsi l'hypothèse d'une dégradation de la lame basale par les

métalloprotéases de la famille MMP (matrix metalloproteinase) dans le processus de passage des MKs.



**Axe 1. Comprendre la nature
des extensions émises par les
MKs, en particulier leur
organisation du cytosquelette**

1. Résumé de l'étude

Au sein de la moelle osseuse, l'une des étapes clefs dans la génération des plaquettes sanguines est le passage de fragments cytoplasmiques des MKs au travers de la barrière sinusoidale. Cette étape reste à l'heure actuelle encore peu connue du fait de la difficulté de capturer ces événements. L'objectif de cette étude a été de comprendre comment les MKs interagissent et traversent les sinusoides médullaires. Pour répondre à cette question, nous avons entrepris une analyse détaillée *in situ* des zones de contacts entre les MKs et les cellules endothéliales dans le microenvironnement natif 3D de la moelle osseuse en combinant différentes approches d'imagerie en microscopie électronique et en microscopie à fluorescence.

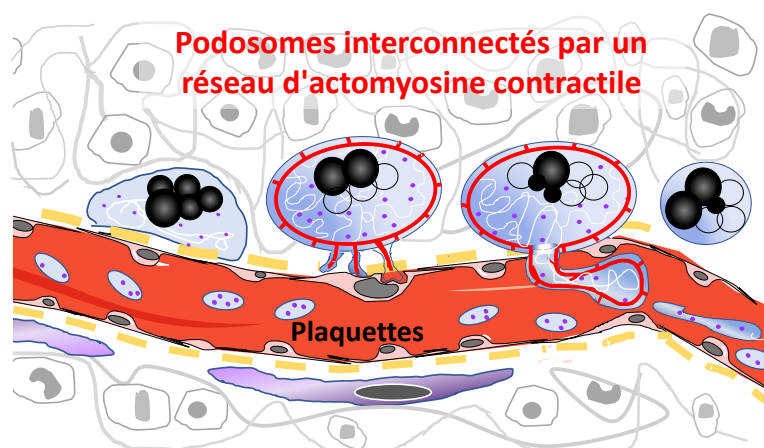
L'observation ultrastructurale des **cellules endothéliales des sinusoides montre une monocouche continue et non fenêtrée, sans ouvertures pré-existantes**. Ainsi, pour traverser la barrière endothéliale, les MKs doivent se créer un passage. Pour cela, les MKs forment de courtes protrusions invasives pouvant s'invaginer profondément dans la cellule endothéliale jusqu'à la traverser. Ces passages se font directement à travers la cellule endothéliale indiquant que le MK emprunte un chemin transcellulaire. Les protrusions ne sont présentes que dans les MKs les plus matures et trouvent leur origine dans la zone périphérique des MKs connue pour être riche en cytosquelette d'actomyosine. Cela nous a conduits à examiner l'organisation du cytosquelette d'actine dans les protrusions émises par les MKs.

Visualisée par immunofluorescence, l'organisation des filaments d'actine dans les protrusions consiste en un pilier orienté perpendiculairement à la surface endothéliale. Cette organisation caractéristique, ainsi que la présence/localisation de marqueurs tels que la cortactine et la taline, leur architecture spécifique en forme de courtes protrusions et leurs propriétés invasives sont autant d'éléments de reconnaissance **des podosomes**. Cette étude fait également apparaître **l'organisation collective de ces structures** reliées par un réseau secondaire d'actomyosine présent dans la zone périphérique, tout autour du MK. Ainsi, pour franchir la barrière endothéliale, les MKs ont la particularité de former plusieurs podosomes interconnectés leur permettant de perforer l'endothélium en de multiples points. La microscopie électronique à balayage a révélé l'existence de regroupements de pores transendothéliaux. Il est vraisemblable que cette disposition particulière puisse permettre la fusion des pores et ainsi réguler la taille des points de passage permettant la traversée des

fragments cytoplasmiques volumineux des MKs, sans endommager l'intégrité vasculaire. Décrits jusqu'ici sous forme de podosomes individuels *in vitro*, nous avons ainsi pu démontrer leur existence et leurs fonctions invasives *in vivo*, où les podosomes ont une organisation bien différente de celle observée *in vitro* sous forme interconnectée. On les appelle alors *in vivo*-MK podosomes.

Au regard du rôle essentiel du cytosquelette d'actomyosine dans la structuration des *in vivo*-MK podosomes, nous avons voulu connaître l'impact d'une anomalie de ce réseau sur la capacité des MKs à émettre des podosomes pouvant perforer l'endothélium. Pour cela, nous avons utilisé des souris déficientes en complexe **Arp2/3** et en **myosine IIA** spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire (respectivement *Arp2/3*^{-/-} et *Myh9*^{-/-}). Les résultats obtenus avec la souris *Arp2/3*^{-/-} révèlent la nécessité d'une organisation d'actine branchée pour la formation des podosomes et pour la création de pores transendothéliaux. La souris *Myh9*^{-/-} a permis de mettre en lumière l'importance de l'organisation collective des podosomes. En effet, dans des conditions où le réseau secondaire d'actomyosine contractile de la zone périphérique est incapable de se former, on note la présence de podosomes plus petits, plus nombreux et dispersés sur toute l'interface MK/sinusoïde. Ceci modifie de façon considérable l'entrée du MK dans le sinusoïde sous forme d'une multitude de petits fragments, totalement différents des fragments volumineux et compacts émis par les MKs dans des conditions normales. Des résultats similaires ont été décrits *in vivo* dans des expériences d'imagerie menée en temps réel par microscopie biphotonique¹²⁸.

L'ensemble de ces travaux publié dans le **journal JTH en 2020** met en évidence un processus original et unique du MK reposant sur la formation de podosomes organisés en réseau leur permettant d'adopter un comportement collectif dans la perforation de la barrière endothéliale.



2. Publication

Received: 7 May 2020 | Accepted: 16 July 2020

DOI: 10.1111/jth.15024



ORIGINAL ARTICLE

jth

Megakaryocytes use in vivo podosome-like structures working collectively to penetrate the endothelial barrier of bone marrow sinusoids

Anita Eckly¹ | Cyril Scandola¹ | Antoine Oprescu² | Deborah Michel² |
Jean-Yves Rinckel¹ | Fabienne Proamer¹ | David Hoffmann¹ | Nicolas Receveur¹ |
Catherine Léon¹ | James E. Bear³ | Dorsaf Ghalloussi⁴ | Gabriel Harousseau⁴ |
Wolfgang Bergmeier⁴ | Francois Lanza¹ | Frédérique Gaits-Iacovoni² |
Henri de la Salle¹ | Christian Gachet¹

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

²INSERM U1048, I2MC, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

³Department of Cell Biology and Physiology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina

⁴Department of Biochemistry and Biophysics, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina

Correspondence

Anita Eckly, UMR-S1255 INSERM-Université de Strasbourg, Etablissement Français du Sang-Grand Est, 10, rue Spielmann, B.P. N°36, 67065 Strasbourg Cedex, France.
Email: anita.michel@efs.sante.fr

Funding information

Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: Grant ANR-17-CE14-0001-01 to H.d.S

Abstract

Background: Blood platelets are anucleate cell fragments that prevent bleeding and minimize blood vessel injury. They are formed from the cytoplasm of megakaryocytes located in the bone marrow. For successful platelet production, megakaryocyte fragments must pass through the sinusoid endothelial barrier by a cell biology process unique to these giant cells as compared with erythrocytes and leukocytes. Currently, the mechanisms by which megakaryocytes interact and progress through the endothelial cells are not understood, resulting in a significant gap in our knowledge of platelet production.

Objective: The aim of this study was to investigate how megakaryocytes interact and progress through the endothelial cells of mouse bone marrow sinusoids.

Methods: We used a combination of fluorescence, electron, and three-dimensional microscopy to characterize the cellular events between megakaryocytes and endothelial cells.

Results: We identified protrusive, F-actin-based podosome-like structures, called in vivo-MK podosomes, which initiate the formation of pores through endothelial cells. These structures present a collective and spatial organization through their interconnection via a contractile network of actomyosin, essential to regulate the endothelial openings. This ensures proper passage of megakaryocyte-derived processes into the blood circulation to promote thrombopoiesis.

Conclusion: This study provides novel insight into the in vivo function of podosomes of megakaryocytes with critical importance to platelet production.

KEYWORDS

megakaryocyte, endothelial cells, podosomes, Arp2/3, myosin IIA, thrombopoiesis

Manuscript handled by: Matthew T. Rondina

Final decision: Matthew T. Rondina, 16 July 2020

© 2020 International Society on Thrombosis and Haemostasis

J Thromb Haemost. 2020;00:1–15.

wileyonlinelibrary.com/journal/jth | 1

1 | INTRODUCTION

Megakaryocytes (MKs) generate 10^{11} blood platelets daily whose essential role is to maintain vascular integrity by stopping bleeding at the site of vascular injury. This massive production system is coupled with a set of cell biology processes unique to MKs compared with other blood cell lineages. Located in the bone marrow (BM), they undergo an unusual differentiation process that involves multiple rounds of endomitosis to become highly polyploid cells averaging 50 μm in size.¹ As they mature, they develop a unique intracellular membrane system known as the demarcation membrane system (DMS), which provides the plasma membrane of the future platelets.²⁻⁴ Terminally mature MKs extend cytoplasmic processes into the sinusoidal blood vessels of the BM. These processes are further fragmented into individual platelets in the bloodstream, whereas the polylobulated nucleus remains in the BM. Whole MKs can also extrude from the BM under certain circumstances,^{5,6} but it is debated whether this could take place under normal physiological conditions.⁷

In vivo, the formation of platelets can be divided into two well-recognized phases: (a) megakaryopoiesis, which is the differentiation of BM hematopoietic progenitors into mature MKs, and (b), thrombopoiesis, which composes the delivery of MK-derived processes into BM sinusoid and the subsequent release of platelets. Importantly, between these two phases, a critical step is the passage of the MK fragments through the vascular wall of the sinusoids. This specific intravasation step has no equivalent with any other process of cell intravasation because it requires the extrusion of the entire cytoplasmic mass of the giant MK without damaging the endothelial barrier. The biological importance of this step has been demonstrated in the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS), where mutations in WAS (encoding WAS protein) lead to defective delivery of platelets into the bloodstream. In these patients, ectopic platelet release within the BM environment and premature transmigration of immature MKs have been reported to contribute to microthrombocytopenia (ie, reduced number and size of blood platelets).^{8,9} Intravasation of MKs is therefore a fundamental and regulated aspect of platelet production, in which the initial interactions between MKs and endothelial cells (ECs) play an important role.

Intravasation requires that the MKs make contact with the sinusoid ECs and subsequently penetrate this physical barrier. Very little is known regarding this specific sequence of events, in large part because of their rare and transient nature. Two types of transigrations exist, either at the site of junction between two ECs (paracellular) or directly through the EC body (transcellular). Two earlier ultrastructural studies described that MKs extended pseudopod-like processes across the ECs, but the precise site of transmigration was not identified.^{10,11} More recently, in vitro studies have shown that MKs can form specialized actin-based structures, called podosomes, when exposed to extracellular proteins matrix.^{8,12} Originally described in highly invasive cells such as osteoclasts, macrophages, and dendritic cells, podosomes are mechanosensing specialized organelles implicated in invasion through their ability to

Essentials section

- To produce platelets, megakaryocyte (MK) cytoplasmic fragments must interact and progress through the sinusoid endothelial barrier.
- We characterized the early cellular events taking place between MKs and endothelial cells in the bone marrow native environment.
- Megakaryocytes form F-actin-based in vivo podosome-like structures interconnected through a contractile actomyosin network which allow them to cooperate.
- Collective in vivo podosomes enable the transendothelial passage of megakaryocyte-derived processes.

generate protrusion forces and matrix degradation by metalloproteases. They are characterized by a core of F-actin surrounded by a ring rich of adhesion molecules such as integrins and associated talin and vinculin,¹³ which are highly sensitive to Arp2/3 dependent actin polymerization¹⁴ and profoundly perturbed in WASp patients.¹⁵ Currently, it remains unclear whether such structures exist in the BM microenvironment and, if so, to understand their physiological implication in platelet biogenesis.

This work is focusing on the early cellular events taking place between MKs and ECs in the BM native environment before intravasation and delivery of MK-derived fragments into BM sinusoids. Here, using a combination of high-resolution microscopy approaches, we show that MKs extend protrusive, F-actin enriched podosome-like structures oriented perpendicularly to the endothelium. We call these structures in vivo-MK podosomes. By creating pores directly through ECs, they can find their way across the EC barrier using a transcellular route. Groups of closely positioned in vivo-MK podosomes work collectively to breach the endothelium through their connections to a peripheral actomyosin contractile network. Loss of myosin IIA affects their size, number, and distribution, leading to scattered transendothelial pores. Loss of the Arp2/3 complex profoundly impairs the ability of MKs to initiate transendothelial pores and to expand in vivo intrasinusoidal cytoplasmic processes. In conclusion, our work uncovers in vivo-MK podosomes as an essential structure for communication between MKs and ECs.

2 | METHODS

Detailed methods are described in the Appendix S1.

2.1 | Mice

The *Myh9*^{-/-}, *Yall*, *β 1-tubulin*^{-/-}, and *Arp2/3*^{-/-} mice have been previously described.¹⁶⁻¹⁸ Because previous studies have shown early

embryonic mortality in *Arp2/3* and *MYH9*^{-/-} mice, we used the loxP-Cre system to restrict the *Arpc2* gene (encoding the p34 subunit of the Arp2/3 complex) and the *MYH9* gene knockout to the megakaryocyte lineage. All animal experiments were approved by the local ethics committee.

2.2 | BM preparation

Murine BM was obtained by flushing the femurs of mice with phosphate buffered saline followed by fixation.

2.3 | Confocal microscopy on cryosections

Bone marrow was fixed in 2.5% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde, and frozen in liquid nitrogen as described.⁴ Cryosections of 250-nm thickness were cut and labeled with Alexa488-conjugated phalloidin, an Alexa555-conjugated anti-GPIIb antibody, and primary antibodies against FABP4 or β 1-tubulin. The sections were then labeled with Alexa680-conjugated secondary antibodies of the appropriate species. They were examined under a confocal microscope (TCS SP8, Leica) or by Structured Illumination Microscopy (Elyra PS.1, Zeiss). For the images in Figure 2D, two rounds of immunofluorescence (IF) labeling and imaging were performed as described by Micheva et al.¹⁹

2.4 | Electron microscopy

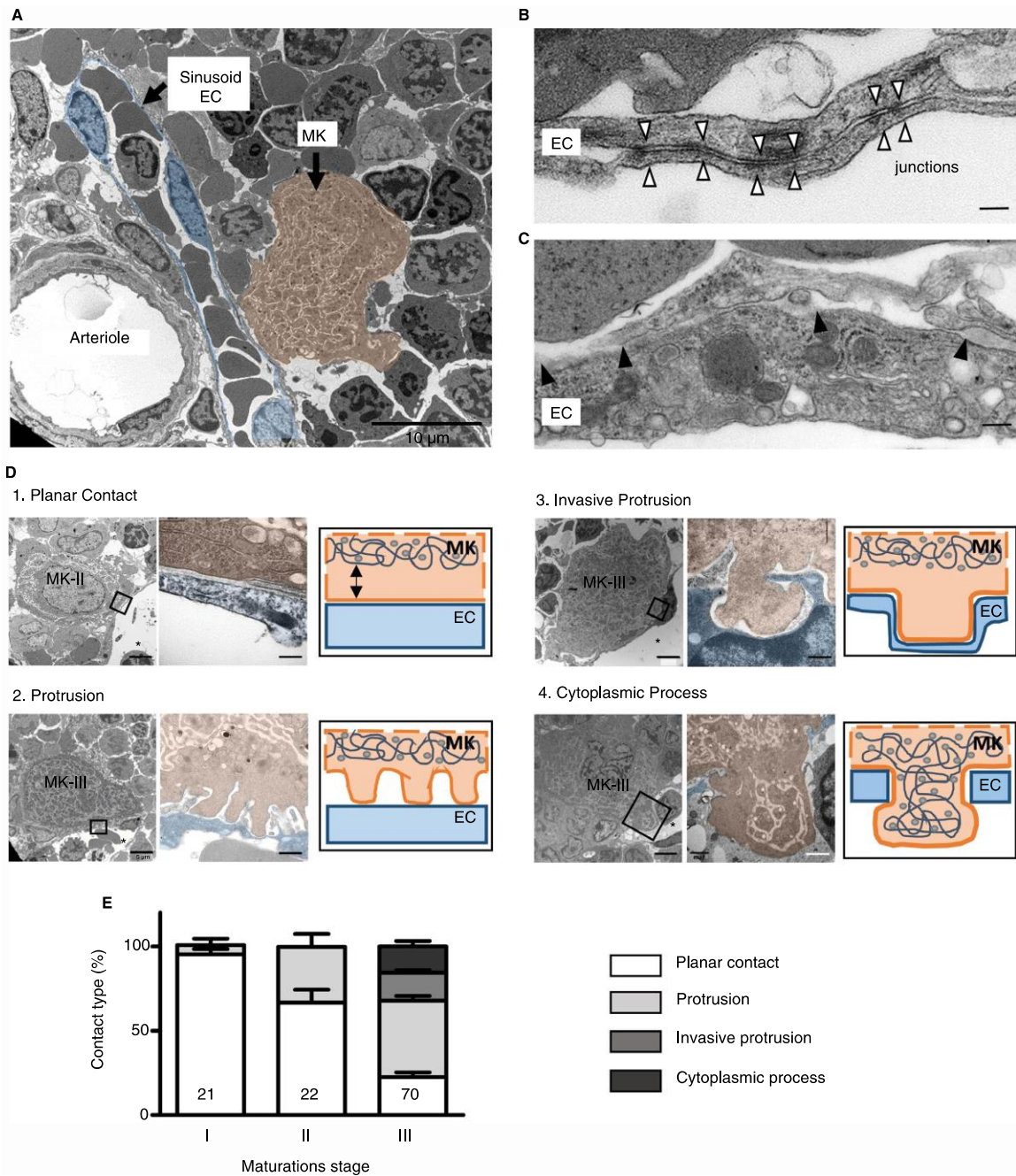
- **Standard electron microscopy (SEM):** Bone marrow was fixed in 2.5% glutaraldehyde and embedded in Epon as described.²⁰ Transversal thin sections of the entire BM were cut and examined under a CM120 TEM (FEI). In some experiments, the BM cells were permeabilized with 0.02% saponin for 5 minutes to visualize the cytoskeleton, before fixation in 2.5% glutaraldehyde and embedding in Epon.
- **Focused ion beam (FIB)/SEM:** Samples were processed and examined under a Helios NanoLab microscope (FEI) as described.²¹
- **SEM:** Fixed samples were broken open with a scalpel and dehydrated. Dried samples, marrow side uppermost, were attached to stubs and sputter coated. Secondary electrons were used to image the inner surface of the sinusoids. To ascertain that MKs were located under the imaged surface, the specimen stage was tilted to 52° and exposed to the focused ion beam and backscattered electrons were used to image the new face of the sample to identify the MKs.
- **Immunoelectron microscopy labeling:** BM cells were permeabilized with 0.02% saponin for 5 minutes, fixed in 2% paraformaldehyde and labeled in suspension. The cells were incubated overnight with anti-myosin or irrelevant antibodies (10 μ g/mL) followed by 10 nm gold-conjugated secondary antibodies and the samples were embedded in Epon.

- **Electron tomography:** Samples were processed as for TEM and 300-nm-thick sections were cut. Single tilt imaging series were recorded using a JEM-2100Plus TEM (Jeol) and processed as previously described.⁴ The tilt series were aligned and reconstructed three-dimensionally (3D) using a TEMography Recorder (TOMO-MOD2).
- **Correlative light and electron microscopy on cryosections:** 100-nm-thick cryosections were mounted on formvar-carbon coated grids. The regions of interest were first examined under the IF microscope (as described previously) and their coordinates relative to the grid were recorded before being examined under the TEM. The two pictures were superimposed using “picture overlay” software (Jeol).

3 | RESULTS

3.1 | In vivo characterization of the contacts between MK and sinusoids

In BM, the passage of MK-derived processes through the vascular wall of the sinusoids are rare, transient, and unpredictable; it is thus challenging to catch MKs in the act of penetrating the sinusoid barrier. Because so little was known about this specific step, we first characterized the cellular events occurring at the interface between MK and endothelial cells. MKs and sinusoids are easily recognized by their large size and their irregular channel morphology, respectively (Figure 1A). Consistent with earlier reports,^{10,22} we observed that the endothelial lining of the sinusoid is continuous without preformed apertures indicating that MKs have to mechanically alter the EC barrier for intravasation. ECs are joined together by electron-dense junctions (Figure 1B) and the subjacent basement membrane was found to be discontinuous with empty spaces of 1400 ± 76 nm in length ($n = 55$) (Figure 1C). Intercellular contacts between sinusoidal MKs and ECs being low-frequency events, their analyses required the observation of a large number of thin sections. Typically, we found that $38 \pm 2\%$ of MKs are in direct contact with sinusoids, corresponding to ~ 12 contacts per BM transversal section. Four types of contacts could be discriminated according to their morphology and their ability to invade the endothelium (Figure 1D). We found (a) planar contacts between MKs and ECs, (b) MK protrusions without any visible effect on the ECs, (c) MK invasive protrusions deforming the EC surface, and (d) MK cytoplasmic processes filled with DMS and organelles and passing through the endothelium. The percentage of MKs showing these four characteristic contacts was 45 ± 3 , 35 ± 2.5 , 11 ± 2 and 9 ± 1.5 , respectively ($n = 235$ MK/EC contacts analyzed in 18 sections from nine wild-type [WT] mice). Also, consistent with previous intravital microscopy studies,²³⁻²⁵ we did not see entire MKs in the lumen of the sinusoids. To determine whether there was a link between the type of interaction and the degree of MK maturation, we classified the contacts according to MK morphology. MKs were ranked



in three maturation stages (I, II, and III) based on cell size, nuclear morphology, and DMS development.²⁰ MK invasive protrusions were mostly observed in fully mature and DMS-rich MKs, whereas planar contacts dominated in immature MKs (Figure 1E), indicating that there is a correlation between the stage of maturation and the ability to extend protrusions.

3.2 | MK protrusions are podosome-like structures interconnected via a peripheral network of actomyosin filaments

TEM observations showed that the MK protrusions are devoid of DMS and intracellular organelles (Figure 1D) and thus are of similar

FIGURE 1 Megakaryocyte-EC interactions involve four different types of contacts. (A) Representative TEM image showing an MK (highlighted with a 75% transparency orange overlay) in close contact with a sinusoid, which forms a continuous barrier. The monolayer of sinusoidal EC is indicated with a 75% transparency blue overlay. (B) At higher magnification, two endothelial cells are bound together by numerous tight junctions (white arrowheads), whereas (C) the basement membrane is discontinuous. The black arrowheads delimit the openings. MK, megakaryocyte; EC, endothelial cell. Scale bars represent 10 μm in (A) and 500 nm in (B) and (C). (D) Ultrastructure of the types of contact between MK and sinusoidal EC. Three images are shown for each type of contact: left, overviews of MK attached to sinusoids; middle, details of the boxed areas; right, models illustrating the different types of MK/EC contacts. In (1) planar contact, in (2) an MK has developed three protrusions toward the EC, in (3) a MK forms an invasive protrusion deforming the EC surface, and in (4) an MK extends a cytoplasmic process into the lumen (*) of the sinusoid. In the middle panels, MKs are indicated with a 75% transparency orange overlay and EC with a 75% transparency blue overlay. MK-II and MK-III indicate the stage of maturation. Scale bars represent 5 μm in the left panels and 1 μm in the middle panels. For the TEM images, 18 sections coming from nine WT mice were observed. Gray lines, DMS; gray circles, granules. (E) Bar graph showing quantification of the types of MK/EC contact at different stages of MK maturation. Bars correspond to the mean percentage of each type of contact \pm SEM ($21 < n < 70$, as indicated in the open bars)

nature as the peripheral zone of mature MKs. Because this zone is known to be rich in actomyosin,²⁶ we decided to investigate their cytoskeletal organization by IF microscopy. To increase the chance to observe these low occurrence events, we employed the *Yall* mouse model that present the advantage to increase by 5-fold the number of MKs in the BM (driven by a misbalance between thrombopoietin and its receptor).¹⁶ We confirmed that *Yall* MKs displayed the same morphological features as WT ones (Figure S1). To locate MKs in contact with sinusoids, BM cryosections were stained for the MK-specific marker GPIIb β and for the EC marker fatty acid binding protein 4 (FABP4)²⁷ (Figure 2A-B). The strong cytosolic labeling of FABP4 allowed to better delineate the transendothelial penetration of the MK protrusions than classically used EC surface markers, such as PECAM.1. Three different stages of intravasation, captured in a single shot in Figure 2Ai, were analyzed at higher magnification: a MK with invasive protrusions (Figure 2Aii), an MK extruding a single process (Figure 2Aiii) or a large extension (Figure 2Aiv). In each cell, F-actin formed a continuous ring at the MK periphery with short radiating F-actin structures. Using structural illumination microscopy super-resolution microscopy (Figure 2B), the radiating F-actin structures appeared clearly lying perpendicular to the endothelium and penetrating this barrier (arrowheads in Figure 2B). Remarkably, these perpendicular actin-rich structures were linked at their base to a peripheral submembranous F-actin network (arrows in Figure 2B). Using correlative light electron microscopy (CLEM) to superimpose fluorescent signals and EM images, we ensured that the phalloidin-stained F-actin entirely filled MK protrusions which deformed the surface of the endothelium, in the same manner as the protrusions observed previously (Figure 2C). This F-actin organization in the MK protrusion and the ability of MKs to form classic podosomes *in vitro*¹² led us to determine whether these *in vivo* observed protrusions could be native podosomes as well. We checked for the presence of F-actin-binding proteins classically associated with podosomes (ie, myosin IIA, cortactin, and talin) (Figure 2D). IF analysis was performed either on tangential views showing radiating F-actin pillars oriented perpendicularly to the endothelium or transversal views showing bright dots of F-actin inside GPIIb β -stained extensions (Figure 2D). Line scans of the fluorescence intensity passing through the F-actin columns indicated that all three proteins were located within GPIIb β -stained extensions, but their respective distribution

differed. Myosin IIA and cortactin colocalized with F-actin, whereas talin formed circular structures outside the bright F-actin dots, as revealed on transversal views of the MK surface (inset in Figure 2Dvii). Thus, the MK protrusions at this point seem to be compositionally similar to podosomes in other cell types.

Overall, these observations revealed that mature MKs form podosome-like structures *in vivo*, in which actomyosin is the primary cytoskeletal component. The localization of myosin in podosomes has been intensively discussed in the literature and appears to depend on the selected cell type.²⁸⁻³⁰ To precise the localization of myosin in MKs, we analyzed more carefully the fibrillar organization of the F-actin network. To do so, we used saponin-permeabilized BM, which permits extraction of the soluble cytoplasmic proteins that otherwise mask and obscure the filamentous cell structures (Figure 3). EM revealed that the MK protrusions contain microfilaments arranged into two distinct networks with orthogonal orientations. One is oriented perpendicular to the endothelium (arrowheads) and is connected at its base to a second network running parallel to the EC plasma membrane (arrows), similarly to what was observed in the IF experiments (Figure 3A-B). Remarkably, this second network forms a large intracellular circular lattice at the MK periphery and connects several F-actin pillars (Figure 3A-B). It was made of tightly packed thick myosin fibers, as demonstrated by immunoelectron microscopy (inset in Figure 3C).

Collectively, these data clearly showed that the MK protrusions present the characteristic features of podosomes, ie their perpendicular F-actin organization to its substrate (EC in this case) and their collective organization via a peripheral network composed of myosin IIA-decorated F-actin fibers. We called these structure *in vivo*-MK podosomes.

3.3 | MK-dependent initiation of transendothelial cell pores

We next asked how these *in vivo*-MK podosomes affected the endothelial barrier. By TEM, we observed that they penetrated deeply into the endothelium resulting in tight apposition of the apical and basal EC plasma membranes (Figure 4A-B). To understand the details of these membrane interactions, we turned to EM tomography (Figure 4C). The 3D images of tilted sections revealed that two EC bilayers came

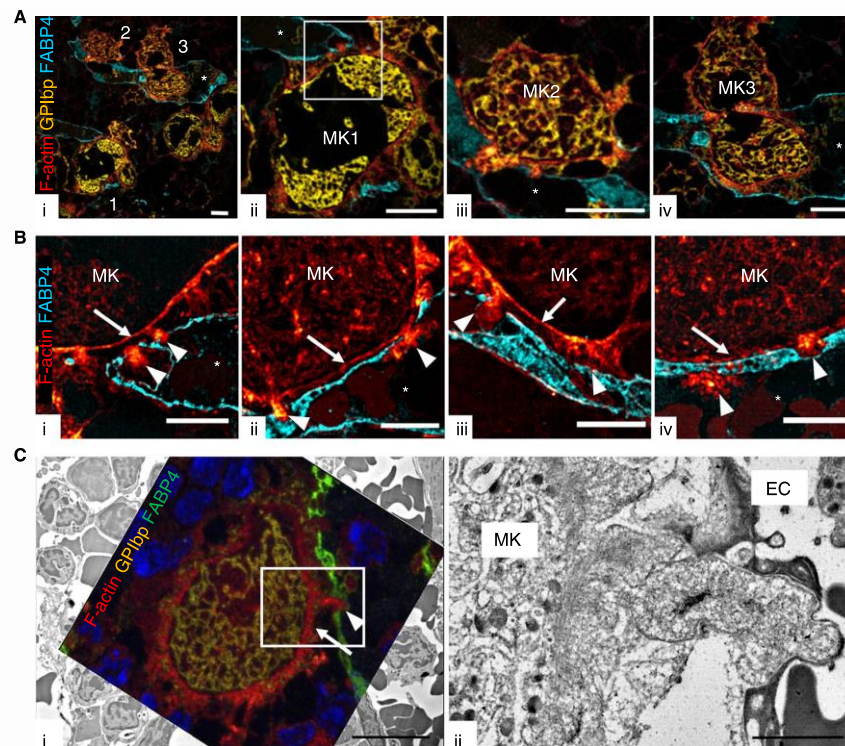


FIGURE 2 Megakaryocyte protrusions are invasive, F-actin-based podosome-like structures. (A-B) Cryosections of BM from *Yall* mice were stained with an anti-GPIIb β mAb (to detect MK, yellow), an anti-FABP4 mAb (to detect EC, blue) and phalloidin-488 (to detect F-actin, red). (A) Representative confocal images showing (i) an overview of a BM section with three types of MK/EC contacts; (1) is an MK extending two protrusions, (2) is an MK extending a cytoplasmic process into the lumen, and (3) is an MK extending a large intravascular fragment. Higher magnifications of the three MKs are shown in (ii), (iii), and (iv), respectively. A higher magnification of the boxed area in Aii, flipped 180° is shown in Bi. Star, sinusoidal lumen, bars: 10 μ m. (B) Four examples of SIM super-resolution images showing short F-actin staining perpendicular to the endothelium, passing through or pushing against the endothelial barrier (white arrows). Note that the F-actin staining is connected to the circular PZ network of actin (white arrowheads). Star, sinusoidal lumen; bars, 1 μ m. Views are representative of three independent immunostainings in three different *Yall* mice, more than 50 MKs were observed. (C) Correlative IF and TEM analyses of a MK protrusion. Cryosections of *Yall* BM were stained with an anti-GPIIb β mAb (yellow), an anti-FABP4 mAb (green), phalloidin-488 (red), and DAPI (blue). (i) Superimposed IF and EM micrographs showing the same MK in contact with a sinusoid. The boxed area in (i) is magnified in (ii). Bar: 10 μ m. (ii) In the correlative EM image, the MK protrusion coincides with the actin-rich staining in (i). Bar: 2 μ m. Images are representative of two independent CLEM experiments. (D) Invasive MK protrusions are enriched in myosin IIa, cortactin, and talin. Upper image: schematic representation of the selected orientation planes. Cryosections of BM from *Yall* mice were stained with an anti-GPIIb β mAb (to detect MK, yellow), an anti-FABP4 mAb (to detect EC, dotted red lines), phalloidin-488 (to detect F-actin, green), an anti-myosin IIa, anti-cortactin IIA, or anti-talin (red) and DAPI (blue). (i-iii) Tangential view images of an MK in contact with a sinusoid delineated by the broken line. (v-vii) Transversal view through the peripheral zone of an MK. Bars: 10 μ m. (iv and viii) Graphs showing the overlay of the fluorescence intensity (in arbitrary units: a.u.) of the actin staining (green) and the myosin/cortactin/talin staining (red) on straight-line sections (solid white lines in the insets). For talin IF staining, the inset in vii shows that talin formed circular structures outside the bright F-actin dots. Results are representative of three independent experiments in three different *Yall* mice

into immediate contact exactly at sites adjacent to *in vivo* MK podosomes and formed hemifused intermediates indicating fusion of the EC plasma membranes (Figure 4D, Movie S1). More advanced steps of this intravasation process could be found on TEM sections with MKs extending *in vivo* podosomes into the sinusoidal lumen through small transendothelial pores (838 ± 65 nm in diameter, $n = 38$) (Figure 4E). These pores occurred at sites distinct from the EC-EC junctions that remained intact (arrowheads in Figure 4E), favoring a transcellular route. Because a single-section TEM cannot conclusively determine the site of

transmigration,³¹ we used FIB-SEM to visualize these events in their entirety (Figure 4F-G). We analyzed 10 sets of consecutive FIB-SEM series along with a 3D reconstruction showing that MKs could extend a multitude of finger-shaped extensions toward the EC surface. These extensions had a height of ~ 600 nm and a submicron diameter. In all of the sets that we analyzed, MKs formed trans-EC pores and not inter-EC crossing, providing firm evidence for a transcellular route (Movie S2). A second observation was that *in vivo*-MK podosomes were able to deform the EC nucleus (Figure 4H), arguably the stiffest intracellular organelle, which

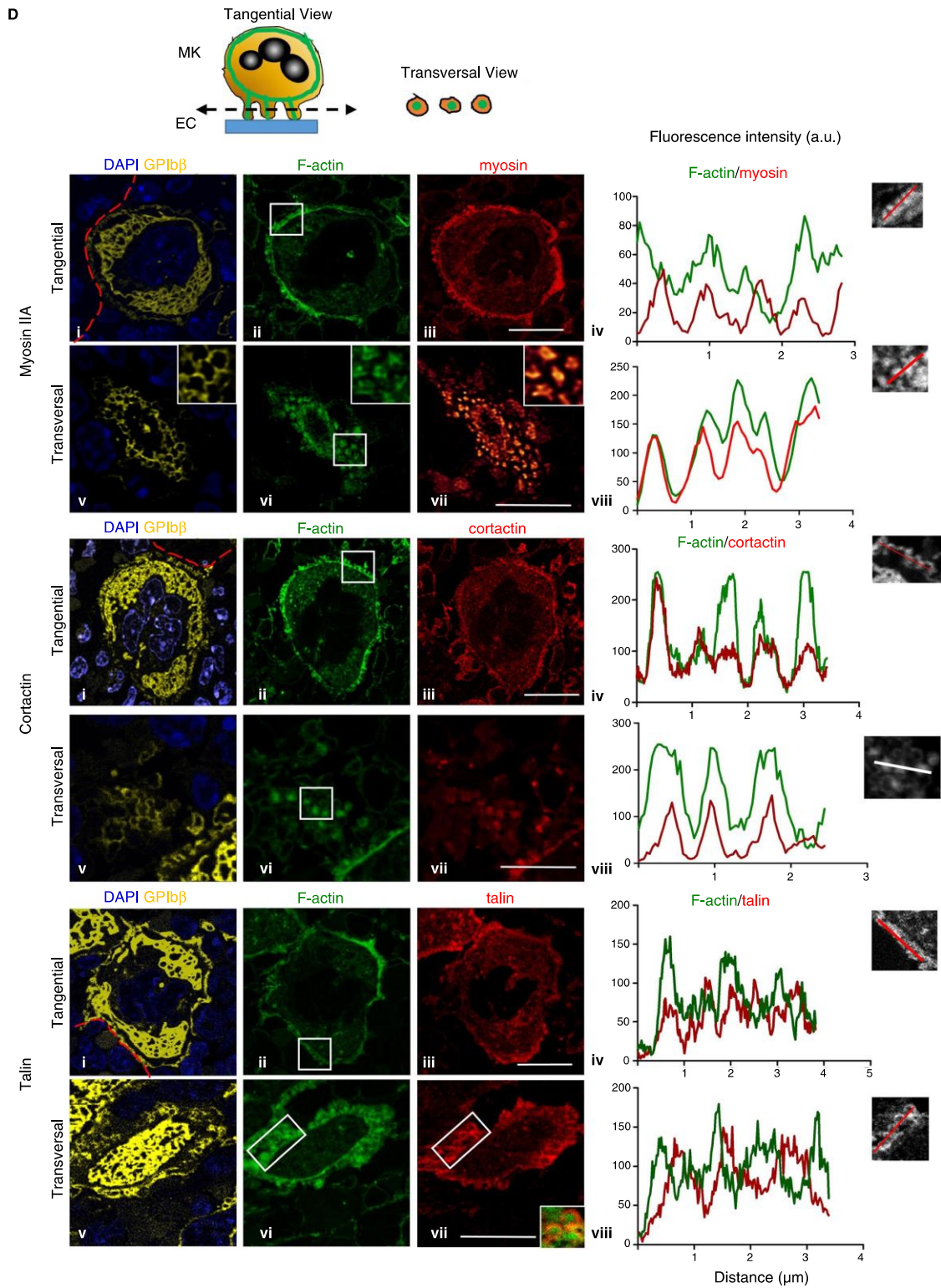


FIGURE 2 Continued

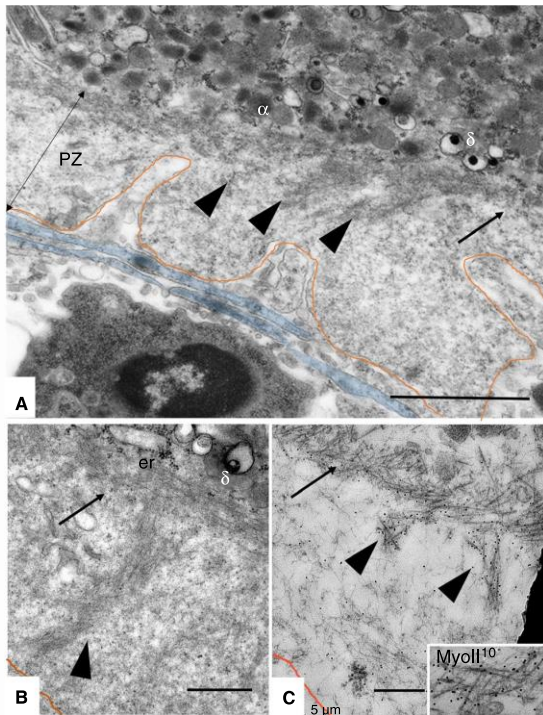


FIGURE 3 Collective organization of the in vivo-podosomes of MKs via a peripheral network of actomyosin. (A-B) TEM images of MK permeabilized with saponin to visualize the cytoskeletal microfilaments in MK protrusions. Filaments are arranged into two types of networks: one is oriented perpendicular to the EC (arrowheads) and is connected at its base to a second network oriented parallel to the EC (arrows). The edge of the MK is delineated with an orange line and the EC with a 75% transparency blue overlay. Views are representative of two independent saponin-treatments on WT mice and three sections per experimental condition were observed. (C) Immunogold EM labeling with an anti-myosin IIA on saponin-permeabilized MK. The inset is a magnification. Images are representative of three independent IEM stainings. α , alpha granule; δ , dense granule; DMS, demarcation membrane system; er, endoplasmic reticulum. Scale bars represent 1 μm

was further confirmed by TEM observations (Figure 4I-J), emphasizing their capacity to apply important forces.

Our TEM observations also indicated that a single MK can generate multiple in vivo podosomes that perforate the sinusoid in close proximity to each other (Figure 5A). To obtain a better appreciation of the perforation process, we inspected the inside of the sinusoids by SEM. This allowed us to visualize different pore arrangements: either pores in close proximity to each other (Figure 5Bi), or pores forming clusters (Figure 5Biii), or a single opening with an enlarged size (Figure 5Biv). Occasionally, budding structures could be observed through these openings, which could correspond to MK extensions. To evaluate this, the BM samples were tilted in the microscope and the surface FIB-milled to reach the exact position

of the pores. MKs identified according to their size, polylobulated nucleus and DMS, were actually present and projected cytoplasmic extensions through the pores at the exact position revealed by SEM observations (Figure 5B, right panels).

Taken together, these detailed two-dimensional (2D) and 3D studies show that in vivo-MK podosomes represent the first events leading to MK intravasation. They trigger the fusion of opposite EC plasma membranes, leading to the formation of small transcellular pores in close proximity to each other.

3.4 | A branched F-actin organization is essential for the generation of MK protrusion-driven transendothelial pores

Having established the structure and the biological activity of the in vivo-MK podosomes, we next examined how interfering with the actin cytoskeleton structures could affect their capacity to drive transendothelial pores. Previous pharmacological approaches clearly highlighted the high sensitivity of podosomes to Arp2/3 activity.¹⁴ We examined BM preparations from mice in which the Arp2/3 complex was compromised specifically in the MK lineage because of the inactivation of Arpc2 gene encoding the p34 subunit of the Arp2/3 complex (*Arp2/3*^{-/-} mice). *Arp2/3*^{-/-} mice exhibit thrombocytopenia (433×10^9 platelets/L) partially caused by the abnormal release of platelet-like elements into the BM compartment (Figure S2).¹⁸ Our IF experiments revealed a lack of in vivo podosome formation and of the peripheral network of F-actin interconnecting podosomes in *Arp2/3*^{-/-} mice (Figure 6A). At the ultrastructural level, this resulted in MKs presenting an irregular peripheral zone or showing signs of cytoplasmic fragmentation (Figure 6Bi-iii). Moreover, the interactions between mature stage III *Arp2/3*^{-/-} MK and EC revealed mostly flat contacts (Figure 6Ci), rare thin protrusions (Figure 6Cii), and an almost total absence of invasive protrusions (Figure 6Ciii). Of note, no MK-driven transendothelial pores could be detected demonstrating a defective capacity of *Arp2/3*^{-/-} MK-derived processes to cross the EC layer. To evaluate the impact in a more dynamic setting, we performed intravital microscopy of calvarial bone marrow. MK-derived structures were rarely detected inside sinusoids in *Arp2/3*^{-/-} mice in contrast with WT mice (12-25 MKs per group, observation time of 50 minutes, three independent experiments for each genotypes) (Figure 6D, Movies S3 and S4). This highlighted the requirement of F-actin polymerization for in vivo-MK podosomes and efficient entry of MK-derived processes into the marrow blood stream.

3.5 | A myosin IIA enriched network is required for the collective organization of in vivo-MK podosomes into clusters and for appropriate trans-EC pore arrangement

The abundance of myosin IIA in in vivo-MK podosomes raised the significance of its function for MK invasiveness. Myosin IIA appears

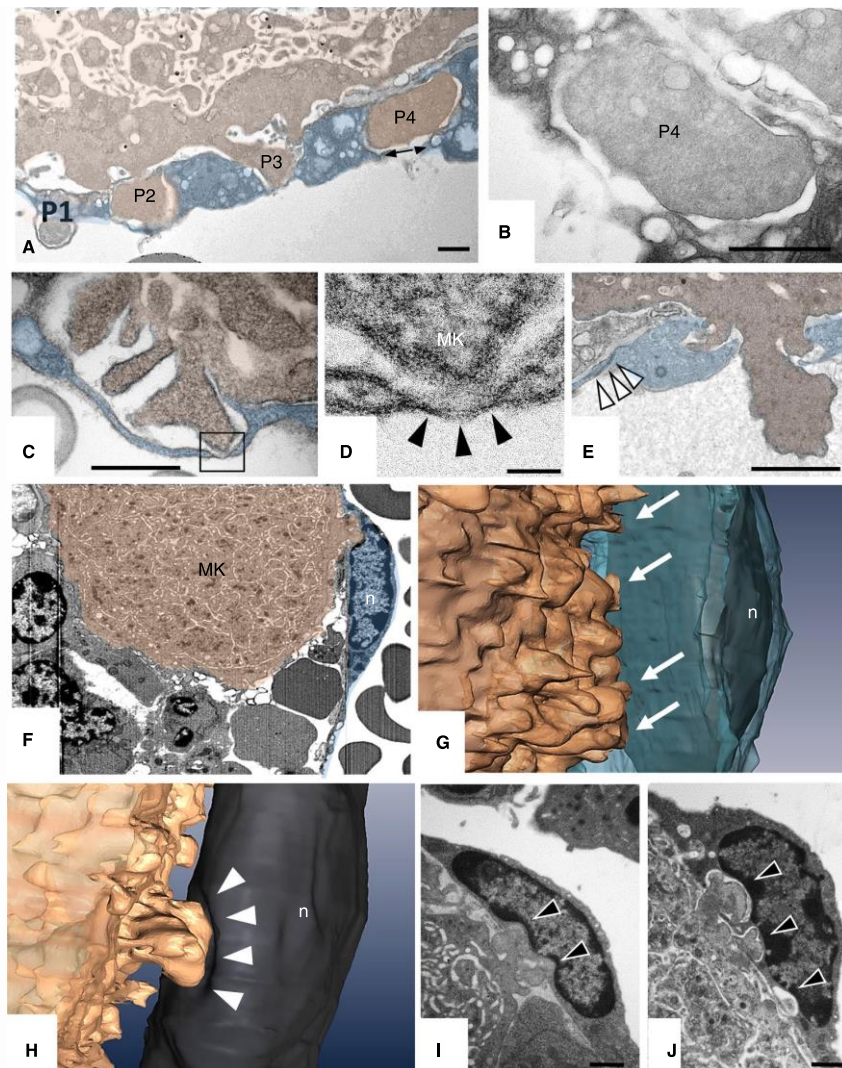


FIGURE 4 Megakaryocyte protrusions squeeze the endothelium causing the formation of transendothelial pores. (A) TEM image of an MK displaying four protrusions (P1-P4) squeezing the EC. (B) Expanded view of protrusion P4, which flattens the endothelium at the point of contact. (C-D) Selected tomographic sections showing fusion of the apical and basal plasma membranes of EC at the sites of adjacent MK protrusions. In D, a higher magnification of the boxed area in C, arrowheads point to the zone of hemifused intermediate membranes (see i Movie S1 for the animation). (E) Representative TEM image showing a MK protrusion extending into the vascular lumen through a small transendothelial pore. Note that the pore passes through a single EC at a point distant from the next EC-EC junction which remains intact (white arrowheads). In panels A, C, and E, MKs are indicated with a 75% transparency orange overlay and EC with a 75% transparency blue overlay. Scale bars represent 2 μm in (A, E), 1 μm in (B), and 50 nm in (C-D). For the 2D TEM, 18 sections coming from nine WT mice were analyzed. For the 3D EM tomography, five MKs forming an invasive protrusion deforming the EC surface were analyzed. (F-G) A typical FIB-SEM analysis illustrating the 3D visualization of all the contact areas between an MK and an EC (arrows). (H) 3D reconstruction of a MK protrusion causing deformation of the endothelial nucleus (n) (white arrowheads) (see Movie S2 for an animation). Images are representative of 10 different FIB-SEM acquisitions. (I-J) Two TEM images of indentations in the EC nucleus exerted by MK protrusions. (H-I) Scale bars represent 1 μm

to be dispensable for the formation of numerous types of podosomes but is important in their collective synchronization and their ability to produce protrusive forces.^{29,30,32} To investigate the role of the myosin II-enriched network, we used mice in which the *Myh9* gene

was specifically inactivated in the MK lineage (*Myh9*^{-/-} mice). We previously reported that these mice are thrombocytopenic (336×10^9 platelets/L) and produced abnormal MKs that lack the peripheral zone.¹⁷ Confocal microscopic analysis of BM sections confirmed

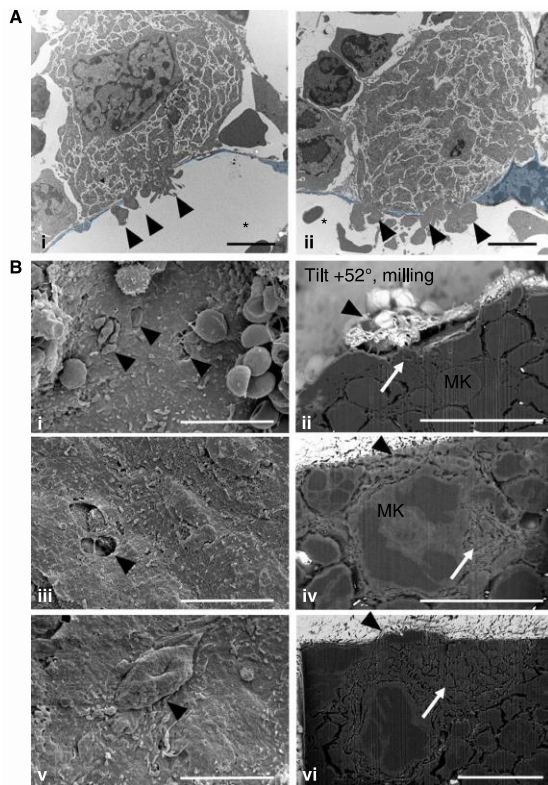


FIGURE 5 Several MK-dependent transendothelial pores combined to penetrate the endothelial barrier. (A) Two representative TEM images (i, ii) showing that the same WT MK is able to perforate the sinusoid at several places (arrowheads). Eighteen sections coming from nine WT mice were analyzed. (*) Lumen of the sinusoid. Bars: 5 μ m. (B) SEM images of *Yall* BM samples showing the luminal side of a sinusoid with openings (arrowheads) appearing as (i) individual small pores, (iii) clusters of pores, or (v) an enlarged pore. Panels on the right (ii, iv, and vi) correspond to the same BM specimen tilted at +52°. The surface was milled and observed under the SEM showing the presence of MK below the endothelial surface, at the exact location of the openings (arrowheads). The MKs were identified according to their size, their polylobulated nucleus, and the presence of the DMS (arrows). Images are representative of three *Yall* mice. Bars, 10 μ m

that the peripheral F-actin staining was absent in *Myh9*^{-/-} MKs, as compared to the intense F-actin accumulation at the periphery of WT MKs (Figure 7A). TEM observations of the MK-EC contact areas revealed that *Myh9*^{-/-} MKs were able to form invasive protrusions, demonstrating that myosin IIA is not absolutely required for their formation (Figure 7B). However, these were clearly thinner than those in WT, with a cross-sectional thickness of $186 \pm 5 \mu$ m versus $568 \pm 30 \mu$ m in WT (Figure 7Biii). This decreased thickness correlated with a decreased volume of the extensions, as seen by 3D FIB-SEM analysis (Figure 7C). Furthermore, in contrast to the grouped

protrusions in WT MKs, they appear scattered over the whole area in contact with the endothelial cells (Movie S5). These morphometric data clearly implicate myosin IIA in the collective organization of in vivo-MK podosomes. In support of this, we found that the transendothelial pores were 1.7 times smaller than in WT cells (505 ± 32 vs 838 ± 65 nm in diameter, $n = 38$ and 47 , respectively). Differences in the MK transmigration sites were also confirmed when we looked at the fourth type of EC-MK contact. In WT mice, the MK extruded one cytoplasmic process through a single transmigrating site having a diameter limited to 7 μ m ($5.7 \pm 0.3 \mu$ m, $n = 10$). In contrast, in *Myh9*^{-/-} mice, multiple smaller transmigration sites ($2.8 \pm 0.2 \mu$ m in diameter, $n = 15$) were detected scattered all over the endothelial surface. These findings were obtained using three distinct approaches (TEM, IF, and FIB-SEM) (Figure 7D) (Movies S5 and S6). Altogether, these data provide firm evidence that myosin IIA-mediated contractility is necessary for the collective organization of in vivo-podosomes of MKs into clusters.

4 | DISCUSSION

Here, a combination of high-resolution microscopy approaches (IF, IEM, CLEM, EM tomography, and FIB/SEM) was used to investigate how MKs interact with the physical barrier of the vascular sinusoids in vivo and to identify the cytoskeletal actors in these processes. We established in vivo-MK podosomes as key components in the early phases of thrombopoiesis from observing that (a) they are short protrusions originating from the peripheral zone of MKs, (b) they can generate mechanical forces capable to physically deform the target EC surface and leading to the formation of transcellular pores, (c) they present the characteristic features of podosomes (ie, their perpendicular F-actin organization to a substrate and contain the typical markers myosin IIA, cortactin and talin), and (d) the peripheral connection with actomyosin allows them to work together to create appropriate transendothelial passage of MK-derived processes (Figure 8).

4.1 | In vivo-MK podosomes invade the endothelium

So far, podosomes from MK have only been identified in vitro upon interaction with matrix-coated (2D) surfaces.^{8,12} Here MK protrusions were observed in situ, which shared numerous features of podosome organization (ie, size, morphology, collective organization, composition, F-actin organization, and protrusive activity).¹³ Remarkably, the MK protrusions crossing the vascular wall of sinusoids strongly resemble two other types of podosomes described in other biological contexts. Lymphocytes have been shown to extend invasive podosomes to form transcellular pores through the endothelium.³³ Invadopodia (another structure homologous to podosome that are both part of the large family of invadosomes) that support invasion of anchor cell in *Caenorhabditis elegans* also bear functional homologies with in vivo-MK

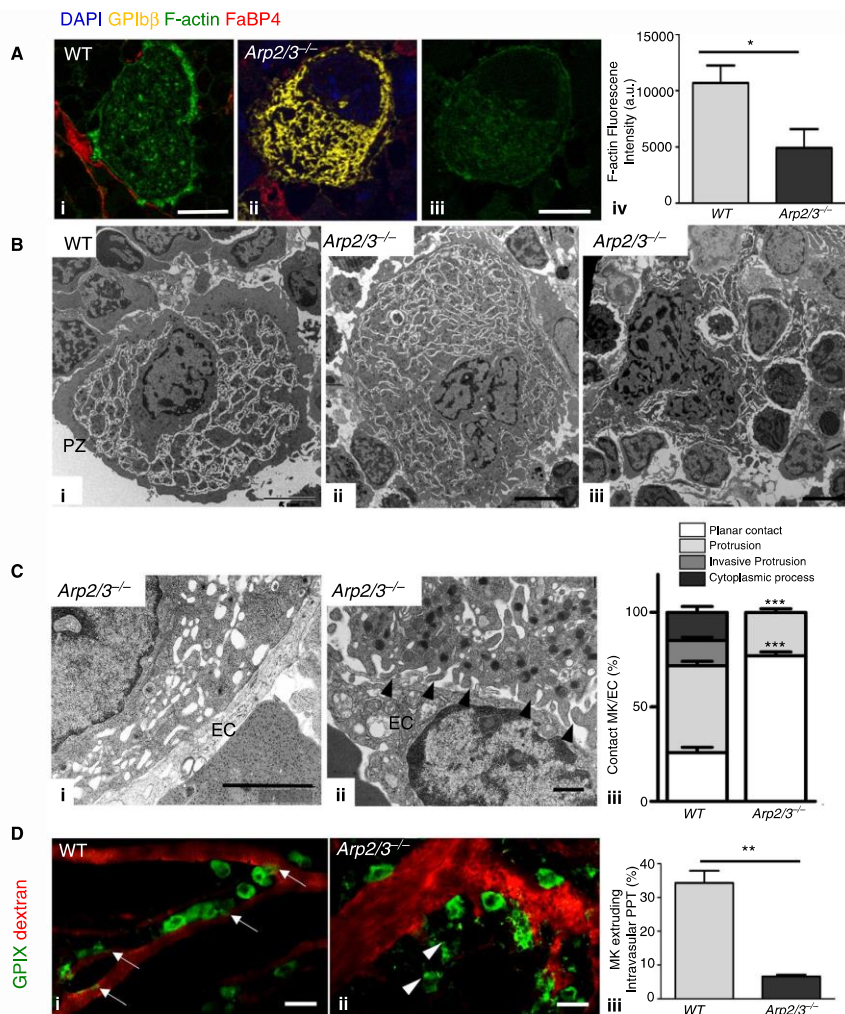


FIGURE 6 Megakaryocytes lacking Arp2/3 are not able to form MK-dependent transendothelial pores. (A) Cryosections from (i) WT and (ii-iii) *Arp2/3^{-/-}* MK were stained with phalloidin-488 (green), anti-GPIIb/3 (yellow), and anti-FaBP4 (red). For the *Arp2/3^{-/-}* MK, the phalloidin staining is shown individually to better distinguish the labeling. Views are representative of three independent immunostainings in three different *Arp2/3^{-/-}* mice. Bars: 10 μ m. (iv) Quantification of the phalloidin-488 fluorescence intensity WT and *Arp2/3^{-/-}* MKs (from three independent IF experiments, $n = 15$ MKs for each genotype). (B) Ultrastructure of BM MK from WT (i) and *Arp2/3^{-/-}* mice (ii, iii). Mature *Arp2/3^{-/-}* MK have an abnormal appearance with an absence of peripheral actomyosin network (ii) and cytoplasmic fragmentation in the hematopoietic compartment (iii). (iii) Scale bars represent 10 μ m. Images are representative of three different mice for each genotype. (C) TEM images of the contact interface between *Arp2/3^{-/-}* MK and EC. (i) The contacts are mostly flat. (ii) Occasionally, *Arp2/3^{-/-}* MKs extended short projections. Bars: 1 μ m. (iii) Quantification of the different types of contact between mature MKs and ECs in WT and *Arp2/3^{-/-}* BM. *Arp2/3^{-/-}* MK are not able to extend protrusions. Data are reported as the percentage of the total number of MK from three independent experiments in three different mice for each genotype ($129 < n < 139$). (D) Intravital microscopy of BM within WT (i) and *Arp2/3^{-/-}* (ii) murine calvarium. z-projection images from time-lapse experiments showing that WT MKs extend elongated cytoplasmic processes (arrows), whereas intrasinusoidal MK fragments were not detected in *Arp2/3^{-/-}* mice. *Arp2/3^{-/-}* MK fragmentation was observed in the BM stroma (arrowheads). MKs are in green, sinusoid vessels are in red. Scale bars, 20 μ m. (iii) Quantification of the MK extruding cytoplasmic processes into sinusoids in WT and *Arp2/3^{-/-}* BM. Results are expressed as percentage of the total population. Data are presented as mean \pm SEM ($n = 3$)

podosomes.³⁴ Finally, the last feature of podosomes is their ability to degrade the extracellular matrix facilitating the crossing through blood vessels. Although it is commonly assumed that cells employ this mechanism

to cross the basement membrane, recent data indicate that invasive cells could also use protease-independent invasion programs using physical force to breach the basement membrane (Guiet et al, 2011).^{34,35} The

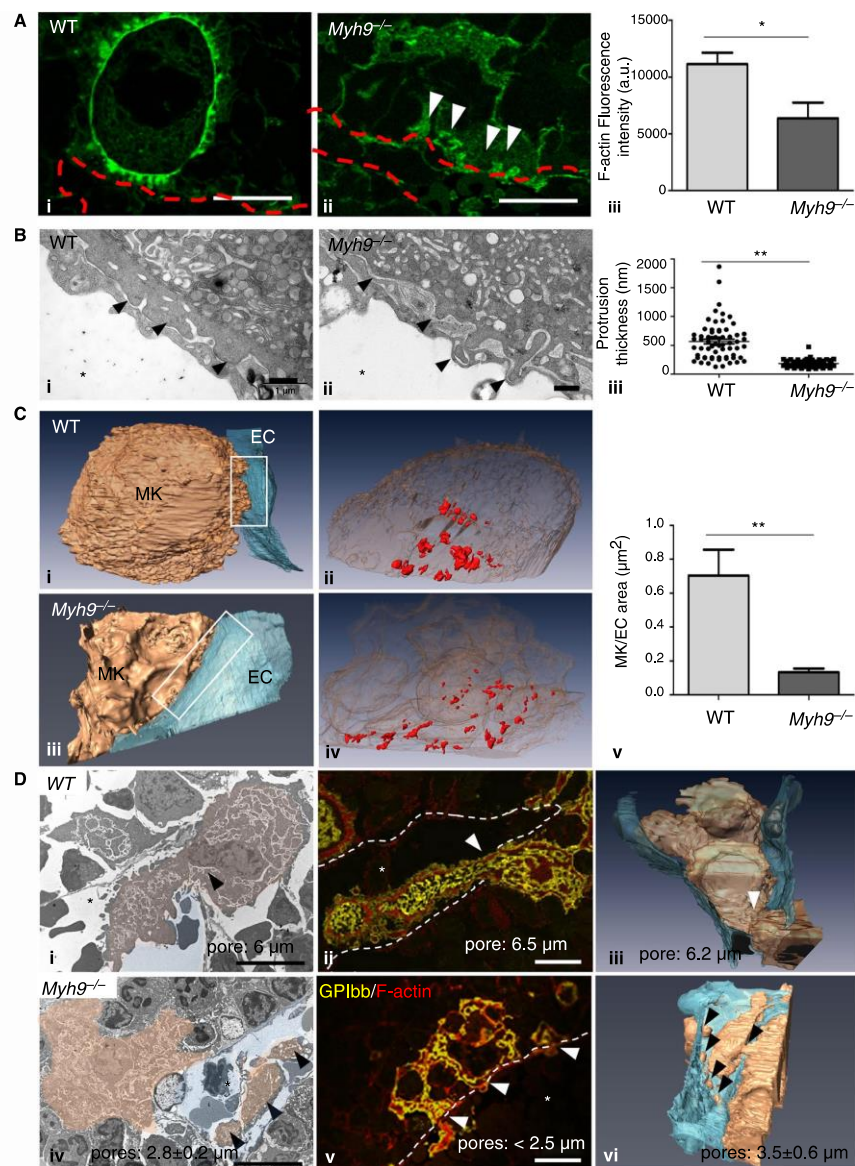


FIGURE 7 The peripheral actomyosin-enriched network is essential for the collective organization of *in vivo*-podosomes of MKs. (A) Cryosections from (i) WT and (ii) *Myh9*^{-/-} BM were stained with phalloidin-488 (green) and anti-FABP4 (dotted red lines). Side views images illustrate defects in F-actin organization in *Myh9*^{-/-} MKs. Images are representative of three independent immunostaining performed on three different mice for each genotype. Bars: 10 μm. (iii) Quantification of the phalloidin-488 fluorescence intensity WT and *Myh9*^{-/-} MKs (from three independent IF experiments, n = 15 MKs for each genotype). (B) TEM images of MK/EC contacts (arrowheads) in the BM from (i) WT and (ii) *Myh9*^{-/-} mice. *Indicates the lumen of the sinusoid. Bar: 1 μm. (iii) Measurement of the protrusion thickness showing the reduced size of *Myh9*^{-/-} MK protrusions (dots) compared with their control littermates (squares). Images are representative of three independent experiments in three different mice for each genotype. (C) Representative 3D reconstructions of (i) a WT and (iii) a *Myh9*^{-/-} MK (orange) in contact with an EC (blue). *Myh9*^{-/-} MK displayed an abnormal shape. (ii) and (iv) Views highlighting the boundaries of the cell/cell contacts (red) in the boxed areas in panels (i) and (iii), respectively. (v) Quantification of the MK/EC contact areas on three different FIB-SEM acquisitions for both genotypes (D) TEM, IF, and FIB/SEM analyses of different transendothelial passage of MK-derived processes in (i-iii) WT versus (iv-vi) *Myh9*^{-/-} BM. In WT mice, note the cell constriction in the region at the level of the endothelium. In *Myh9*^{-/-} BM numerous smaller transendothelial pores were found. Their diameters are indicated in each image. For TEM, 10 sections from WT BM and 15 sections from *Myh9*^{-/-} BM were observed. For IF, images are representative of three independent IF experiments performed on three different mice for each genotype. For 3D EM tomography, three WT and two *Myh9*^{-/-} MKs extending intraluminal cytoplasmic processes were analyzed. Dotted white line, EC; * indicates the sinusoidal lumen. Bars: 10 μm

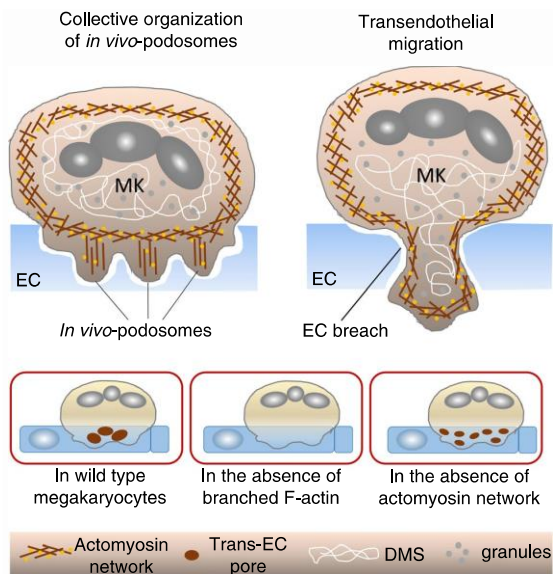


FIGURE 8 Schematic diagrams showing how an MK make contacts with the sinusoid ECs. (A) MKs use podosome-like structures interconnected through a contractile actomyosin network, which allow them to cooperate, thereby enabling the transendothelial passage of MK-derived processes without damaging the sinusoidal wall. (B) Loss of the Arp2/3 complex led to an almost complete inability of MKs to initiate transendothelial pores. Loss of myosin IIA affected the size, number, and distribution of podosomes, leading to the scattering of the transendothelial pores

source of this physical force was shown to be the branched actin network, driven by the Arp2/3 actin nucleation complex, producing invasive membrane protrusions that push aside matrix proteins.^{34,36} This would be consistent with our findings that *in vivo*-MK podosomes are sites of force generation as demonstrated by their ability to deform the endothelial nucleus, and that the Arp2/3 complex plays a key role in the MK-dependent initiation of transendothelial cell pores. MKs have been found to produce and secrete matrix metalloproteinases (MMPs)^{37,38} and *in vitro* studies have shown that MK podosomes were able to degrade matrix proteins in an MMP-dependent manner.¹² However, it is currently unclear whether *in situ* matrix degradation is indeed necessary for the transendothelial passage of MK-derived processes, especially given our observation of gaps in the structure of the basement membrane of BM sinusoids. These gaps could be preexisting areas generated by other cells (such as endothelial cells, pericytes, or other transmigrating blood cells) or could be generated by the MKs themselves during the intravasation step (in an MMP-dependent or MMP-independent manner). Interestingly, they appeared wide enough to allow the passage of the initial *in vivo*-MK podosomes but too small for the passage of the MK-derived cytoplasmic processes observed at later stages of intravasation, suggesting that they are enlarged during the intravasation step. Taken together, the characteristics described for the *in vivo*-MK podosomes, beyond MMPs, correspond to what is expected of a podosome.

4.2 | MK-dependent initiation of transendothelial cell pores requires a branched F-actin organization

The Arp2/3 complex consists of seven protein subunits including two actin-related proteins, Arp2 and Arp3. When activated, Arp2 and Arp3 are brought together to adopt the conformation of actin molecules that can interact with preexisting actin filaments to generate branched actin networks. This dendritic actin network has been demonstrated to generate a pushing force to promote invasive protrusions.^{36,39} *In vitro*, the WASp-Arp2/3 pathway has been shown to be required for the formation of podosomes in MKs spread on collagen and fibrinogen¹² and, in mice loss of the Arp2/3 and WASp proteins is associated with a decrease in platelet count.^{8,18} Here, we demonstrated that a branched F-actin organization is essential for both, the generation of the *in vivo* podosome-driven transendothelial pores and the transendothelial passage of MK cytoplasmic processes. It should be mentioned here that it is not yet known why Arp2/3^{-/-} mice still have circulating platelets when they are unable to form podosomes. Nevertheless, a point that is still unclear is why Arp2/3^{-/-} mice still have circulating platelets. We cannot entirely exclude the possibilities that an Arp2/3 (podosome)-independent mechanism of platelet release into the sinusoids might exist. Indeed, Arp2/3-deficient mice exhibit a significant increase in MK numbers in their spleen,¹⁸ which could compensate for impaired production in the BM. These mice also exhibit significant ectopic platelet release into the BM compartment and it is not known if some of these platelets-like elements can transverse the sinusoids.

4.3 | Collective organization of *in vivo*-MK podosomes requires a peripheral actomyosin network to sustain transendothelial cell pore formation

A specific structure of *in vivo* stage III MKs is the presence of a thick peripheral zone rich in actomyosin. Very little is known concerning the role played by this unique structure. A potential function is to prevent MKs from premature release of extensions within the bone marrow until the MK is fully mature and in the right place to release platelets.^{26,40} Here, through combined fluorescence and ultrastructure imaging, we uncovered that the actomyosin network contained in the peripheral zone serves as a linkage between *in vivo*-MK podosomes. In *Myh9*^{-/-} mice, disruption of this cytoskeletal architecture leads to thinner protrusions and scattered transendothelial pores. In a later stage, this affected the size and the number of MK extensions projected into the vascular lumen, as recently observed in a multiphoton intravital microscopy study.⁴¹ From these observations, we conclude that this peripheral network acts as a scaffold allowing *in vivo*-MK podosomes to be organized into a cluster and support transendothelial penetration. This permits endothelial openings of sufficient size to facilitate passage of MK-derived processes. Collective organization of a group of podosomes into a cluster have been described on the ventral surface of osteoclasts, monocytic cells, and dendritic cells, where myosin IIA-decorated actin filaments

assemble individual podosomes to each other to facilitate long-range basement membrane exploration for a protrusion-permissive spot.⁴²⁻⁴⁵ MKs differ from these cells in the spatial organization of the actomyosin network present under the plasma membrane all around the cell. Because MKs are sessile perivascular cells,²⁴ it is conceivable that this peripheral cytoskeletal organization may allow them to probe the local environment in search of a permissive transendothelial area. Thus, we describe here a novel function of the peripheral actomyosin cytoskeleton as a key regulatory component in the transendothelial passage of MK-derived processes through the coordination of in vivo-MK podosomes and the modulation of MK contractility.

4.4 | Collective action of MK protrusions to produce a physiological transendothelial passage

Our work clearly demonstrates that intravasation of MK-derived processes occurs through the body of the ECs (transcellular route) and not between them. Small pores were detected at sites distinct from the EC/EC intercellular contacts that remained intact. In this regard, we observed that ECs of the sinusoids are connected by tight junctions that would be difficult to break, a process that would likely lead to blood leakage. Different pore arrangements were observed; adjacent ones, clusters, or larger openings, suggesting successive stages of formation to create a normal physiologic transmigration site. The transmigration sites are exit routes for the MK-derived processes. The latter elongate and are remodeled in the blood stream to form the intravascular proplatelets, originally described in vivo by Becker and De Bruyn (1976) and further characterized by Radley and Scurfield (1981), which ultimately produce circulating platelets.^{11,46} The exact mechanisms and sequence of events contributing to the formation of the sites of transmigration are not known. A possible scenario would be that, once an MK has begun the intravasation process, in vivo-MK podosomes enlarge the preformed small pores by pushing vertically on the endothelial barrier and the ensuing coalescence of adjacent pores will then expand into a single macro-opening. The magnitude of the forces applied to the endothelium probably depends on the collective behavior of the in vivo-MK podosomes. This model would recapitulate previously reported mechanisms for the transcellular passage of lymphocytes and pathogens.^{33,47}

In conclusion, the unique nature of MKs has led these giant sessile cells to develop innovative ways to penetrate the endothelial barrier of the sinusoids and deliver cytoplasmic fragments into the circulation. To do this, MKs use a specialized actomyosin structure, the in vivo-MK podosome, whose collective and combined action determines their function in this process. Moreover, the central position of these specific events at the interface between megakaryopoiesis and thrombopoiesis makes this step a key element in the platelet production chain. Any alteration of this major cellular

event has the potential to lead to pathophysiological states such as thrombocytopenia.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Monique Freund (EFS-GEST) and Régis Ravelle-Chapuis (Jeol) for the excellent expert technical assistance; Stephen Weiss, Olivier Destaing, and Carsten Janke for all their input and helpful discussions; and Juliette N. Mulvihill for reviewing the English of the manuscript.

This work was supported by ARMESA (Association de Recherche et Développement en Médecine et Santé Publique), the European Union through the European Regional Development Fund (ERDF), and by Grant ANR-17-CE14-0001-01 to H.d.S. and Grant R01 HL133668 to W.B.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interests to declare.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Anita Eckly and Christian Gachet designed the research; Cyril Scandola, Fabienne Proamer, and David Hoffmann performed the EM and IF experiments; Jean-Yves Rinckel performed the FIB-SEM experiments; Gabriel Harousseau performed the intravital experiments; Anita Eckly observed and interpreted the pictures; Nicolas Receveur assisted with IF experiments; Catherine Léon provided *Myh9*^{-/-} mice; James E. Bear generated the floxed *Arpc2* mice; Dorsaf Ghalloussi and Wolfgang Bergmeier provided *Arp2/3*^{-/-} BM samples; Anita Eckly wrote the paper; Henri de la Salle, Francois Lanza, Wolfgang Bergmeier, and Christian Gachet revised and approved the final version of the manuscript; Deborah Michel and Antoine Opreescu performed the SIM experiments; Frédérique Gaits-lacovoni revised the manuscript.

REFERENCES

1. Guo T, Wang X, Qu Y, Yin Y, Jing T, Zhang Q. Megakaryopoiesis and platelet production: insight into hematopoietic stem cell proliferation and differentiation. *Stem Cell Investig.* 2015;2:3.
2. Radley JM, Haller CJ. The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood.* 1982;60:213-219.
3. Schulze H, Korpál M, Hurov J, et al. Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood.* 2006;107:3868-3875.
4. Eckly A, Heijnen H, Pertuy F, et al. Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood.* 2014;123:921-930.
5. Tavassoli M, Aoki M. Migration of entire megakaryocytes through the marrow-blood barrier. *Br J Haematol.* 1981;48:25-29.
6. Lefrançais E, Ortiz-Munoz G, Caudrillier A, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for hematopoietic progenitors. *Nature.* 2017;544:105-109.
7. Johnston I, Hayes V, Poncz M. Threading an elephant through the eye of a needle: where are platelets made? *Cell Res.* 2017;27:1079-1080.
8. Sabri S, Foudi A, Boukour S, et al. Deficiency in the Wiskott-Aldrich protein induces premature proplatelet formation and platelet production in the bone marrow compartment. *Blood.* 2006;108:134-140.

9. Kahr WH, Pluthero FG, Elkadri A, et al. Loss of the Arp2/3 complex component ARPC1B causes platelet abnormalities and predisposes to inflammatory disease. *Nat Commun.* 2017;8:14816.
10. Lichtman MA, Chamberlain JK, Simon W, Santillo PA. Parasinusoidal location of megakaryocytes in marrow: a determinant of platelet release. *Am J Hematol.* 1978;4:303-312.
11. Scurfield G, Radley JM. Aspects of platelet formation and release. *Am J Hematol.* 1981;10:285-296.
12. Schachtner H, Calaminus SD, Sinclair A, et al. Megakaryocytes assemble podosomes that degrade matrix and protrude through basement membrane. *Blood.* 2013;121:2542-2552.
13. Linder S, Wiesner C. Feel the force: podosomes in mechanosensing. *Exp Cell Res.* 2016;343:67-72.
14. Nolen BJ, Tomasevic N, Russell A, et al. Characterization of two classes of small molecule inhibitors of Arp2/3 complex. *Nature.* 2009;460:1031-1034.
15. Garcia E, Jones GE, Machesky LM, Anton IM. WIP: WASP-interacting proteins at invadopodia and podosomes. *Eur J Cell Biol.* 2012;91:869-877.
16. Tiedt R, Coers J, Ziegler S, et al. Pronounced thrombocytosis in transgenic mice expressing reduced levels of Mpl in platelets and terminally differentiated megakaryocytes. *Blood.* 2009;113:1768-1777.
17. Leon C, Eckly A, Hechler B, et al. Megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation dramatically affects hemostasis while preserving platelet aggregation and secretion. *Blood.* 2007;110:3183-3191.
18. Paul DS, Casari C, Wu C, et al. Deletion of the Arp2/3 complex in megakaryocytes leads to microthrombocytopenia in mice. *Blood Advan.* 2017;1:1398-1408.
19. Micheva KD, O'Rourke N, Busse B, Smith SJ. Array tomography: high-resolution three-dimensional immunofluorescence. *Cold Spring Harb Protoc.* 2010;2010(11):1214-1218.
20. 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.
21. Eckly A, Rinckel JY, Proamer F, Gachet C. High-resolution 3D imaging of megakaryocytes using focused ion beam-scanning electron microscopy. *Methods Mol Biol.* 2018;1812:217-231.
22. Campbell FR. Intercellular contacts between migrating blood cells and cells of the sinusoidal wall of bone marrow. An ultrastructural study using tannic acid. *Anat Rec.* 1982;203:365-374.
23. Junt T, Schulze H, Chen Z, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science.* 2007;317:1767-1770.
24. Stegner D, vanEeuwijk JMM, Angay O, et al. Thrombopoiesis is spatially regulated by the bone marrow vasculature. *Nat Commun.* 2017;8:127.
25. Zhang L, Orban M, Lorenz M, et al. A novel role of sphingosine 1-phosphate receptor S1pr1 in mouse thrombopoiesis. *J Exp Med.* 2012;209:2165-2181.
26. Eckly A, Strassel C, Freund M, et al. Abnormal megakaryocyte morphology and proplatelet formation in mice with megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation. *Blood.* 2009;113:3182-3189.
27. Elmasri H, Karaaslan C, Teper Y, et al. Fatty acid binding protein 4 is a target of VEGF and a regulator of cell proliferation in endothelial cells. *FASEB J.* 2009;23:3865-3873.
28. Lee BS. Myosins in osteoclast formation and function. *Biomolecules.* 2018;8:157.
29. Labernadie A, Bouissou A, Delobelle P, et al. Protrusion force microscopy reveals oscillatory force generation and mechanosensing activity of human macrophage podosomes. *Nat Commun.* 2014;5:5343.
30. van den Dries K, Meddens MB, de Keijzer S, et al. Interplay between myosin IIA-mediated contractility and actin network integrity orchestrates podosome composition and oscillations. *Nat Commun.* 2013;4:1412.
31. Feng D, Nagy JA, Pyne K, Dvorak HF, Dvorak AM. Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J Exp Med.* 1998;187:903-915.
32. van den Dries K, Nahidiazar L, Slotman JA, et al. Modular actin nano-architecture enables podosome protrusion and mechanosensing. *Nat Commun.* 2019;10:5171.
33. Carman CV, Sage PT, Sciuto TE, et al. Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity.* 2007;26:784-797.
34. Kelley LC, Chi Q, Caceres R, et al. Adaptive F-actin polymerization and localized ATP production drive basement membrane invasion in the absence of MMPs. *Dev Cell.* 2019;48(3):313-328.e8.
35. Rowe RG, Weiss SJ. Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol.* 2008;18:560-574.
36. Caceres R, Bojanala N, Kelley LC, et al. Forces drive basement membrane invasion in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115:11537-11542.
37. Lane WJ, Dias S, Hattori K, et al. Stromal-derived factor 1-induced megakaryocyte migration and platelet production is dependent on matrix metalloproteinases. *Blood.* 2000;96:4152-4159.
38. Malara A, Ligi D, Di Buduo CA, Mannello F, Balduini A. Sub-cellular localization of metalloproteinases in megakaryocytes. *Cells.* 2018;7:80.
39. Molinie N, Gautreau A. The Arp2/3 regulatory system and its deregulation in cancer. *Physiol Rev.* 2018;98:215-238.
40. Tablin F, Castro M, Leven RM. Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *J Cell Sci.* 1990;97(Pt 1):59-70.
41. Bornert A, Boscher J, Pertuy F, et al. Cytoskeletal-based mechanisms differently regulate in vivo and in vitro proplatelet formation. *Haematologica.* 2020;105. [epub ahead of print]. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.239111>
42. Bhuwania R, Cornfine S, Fang Z, Kruger M, Luna EJ, Linder S. Supervillin couples myosin-dependent contractility to podosomes and enables their turnover. *J Cell Sci.* 2012;125:2300-2314.
43. Meddens MB, Pandzic E, Slotman JA, et al. Actomyosin-dependent dynamic spatial patterns of cytoskeletal components drive meso-scale podosome organization. *Nat Commun.* 2016;7:13127.
44. Georgess D, Machuca-Gayet I, Blangy A, Jurdic P. Podosome organization drives osteoclast-mediated bone resorption. *Cell Adh Migr.* 2014;8:191-204.
45. Proag A, Bouissou A, Mangeat T, et al. Working together: spatial synchrony in the force and actin dynamics of podosome first neighbors. *ACS Nano.* 2015;9:3800-3813.
46. Becker RP, De Bruyn PPH. The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *Am J Anat.* 1976;145:183-205.
47. Lemichez E, Gonzalez-Rodriguez D, Bassereau P, Brochard-Wyart F. Transcellular tunnel dynamics: control of cellular dewetting by actomyosin contractility and I-BAR proteins. *Biol Cell.* 2013;105:109-117.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Eckly A, Scandola C, Oprescu A, et al. Megakaryocytes use in vivo podosome-like structures working collectively to penetrate the endothelial barrier of bone marrow sinusoids. *J Thromb Haemost.* 2020;00:1-15. <https://doi.org/10.1111/jth.15024>

SUPPLEMENTAL DATA

Megakaryocytes use in vivo podosome-like structures working collectively to penetrate the endothelial barrier of bone marrow sinusoids

Anita Eckly¹, Cyril Scandola¹, Antoine Oprescu², Deborah Michel², Jean-Yves Rinckel¹, Fabienne Proamer¹, David Hoffmann¹, Nicolas Receveur¹, Catherine Léon¹, James E. Bear³, Dorsaf Ghalloussi⁴, Gabriel Harousseau⁴, Wolfgang Bergmeier⁴, Francois Lanza¹, Frédérique Gaits-Iacovoni², Henri de la Salle¹, Christian Gachet¹

¹Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand Est, BPPS UMR-S 1255, FMTS, F-67065 Strasbourg, France.² INSERM U1048, I2MC, Université Paul Sabatier, F-31432 Toulouse, France. ³Department of Cell Biology and Physiology, and ⁴Department of Biochemistry and Biophysics, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC..

Correspondance to:

Anita ECKLY
UMR-S1255 INSERM-Université de Strasbourg
Etablissement Français du Sang-Grand Est
10, rue Spielmann, B.P. N°36
67065 Strasbourg Cedex, France
anita.michel@efs.sante.fr
Tel: (33) 388 21 25 25
Fax: (33) 388 21 25 21

METHODS

Materials

Bovine serum albumin (BSA), glycine, Tris-buffered saline, gelatin from porcine skin, chromium potassium sulphate dodecahydrate, anti-myosin IIA (M8064-2ML) and anti-cortactin (p80/85, clone 4F11) antibodies were from Sigma-Aldrich Merck (Darmstadt, Germany). Glutaraldehyde and paraformaldehyde were from Euromedex (Souffelweyersheim, France). The anti-FABP4 antibody (AF1443) was from R&D Systems (Heidelberg, Germany) and Alexa-488-phalloidin (PHDG1) from Cytoskeleton (Denver, USA). Anti-talin antibodies (Ab71333) were from AbCam (Cambridge, United Kingdom). A rat mAb against mouse GPIIb β (RAM.1-488) and anti- β 1tubulin produced and labelled in our laboratory. Goat anti-rabbit and anti-mouse antibodies and DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole, dilactate) were from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Gold-conjugated protein A was from the Cell Microscopy Center (Utrecht, The Netherlands).

Mice

The *Myh9*^{-/-}, *Yall*, *β 1-tubulin*^{-/-} and *Arp2/3*^{-/-} mice have been previously described (Leon et al., 2007; Paul et al., 2017; Tiedt et al., 2009). Since previous studies have shown early embryonic mortality in *Arp2/3* and *MYH9*^{-/-} mice, we used the loxP-Cre system to restrict the *Arpc2* gene (encoding the p34 subunit of the Arp2/3 complex) and the *MYH9* gene knock out to the megakaryocyte lineage. All animal experiments were approved by the local ethics committee.

Confocal microscopy on cryosections

3-color immunofluorescence imaging: Fresh BM was fixed with 2.5% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in 0.2 M sodium cacodylate buffer for 1 h. The fixed samples were infiltrated with 2.3 M sucrose and frozen in liquid nitrogen. Cryosections of ~250 nm were obtained at -110°C with a LEICA ultrathin cryosections cutter, mounted on gelatin-coated coverslips (coated with 0.5% gelatin and 0.05% chromium potassium sulphate) and placed on a hot plate (~ 60°C) for 30 min. The sections were rinsed in Tris containing 50 mM glycine (5 min), in Tris containing 0.1% acetylated BSA (BSAc, Aurion) and 0.05% TWEEN (Fluka, 93773) (5 min) before overnight incubation with primary anti-FABP4 antibodies (3 μ g/mL in Tris/0.1%BSA/0.05%TWEEN) or the corresponding non-immune antibodies. The next day, the

cryosections were labelled for 1 h with a mixture of Alexa488-conjugated phalloidin (1/150 dilution), Alexa-555 conjugated anti-GPIIb β (RAM.1-555; 1/300) and Alexa 647-conjugated anti goat antibody (dilution 1/150) in Tris/0.1%BSA/0.05%TWEEN, after which the nuclei were counterstained with DAPI. The slides were examined under a confocal microscope (TCS SP8, Leica Microsystems) and MKs were imaged as single slices at x63 magnification using zooms of 0.75 (wide view enabling one to locate the region of interest, ROI), 2.5 (view of an entire MK) and 5 (protrusion details). The BM specimens from 3 mice were examined under identical conditions, using a constant exposure and the same irrelevant antibodies. No fluorescence was detected using isotype-specific control IgG. For quantification, a macro was developed for automatic assessment of cell morphology with ImageJ ver. 1.51r (National Institutes of Health, Bethesda, MD). In brief, for fluorescence intensity measurements, images of GPIIb β labelling were converted to 8-bit images before being auto-thresholded to binary photos using the default method of the “Make Binary” function in ImageJ. Threshold element corresponding to a MK was added on the ROI Manager and was used to calculate the fluorescence intensity of Actin channel. For morphological parameters of cells, we used the Shape Descriptors plugin from ImageJ. The protrusion length have been analyzed with the ImageJ software on confocal pictures acquired at the magnification x63 with a digital zoom of 5. Of note, F-actin labeling was also present in ECs, but is hidden in the pictures by the anti-FABP4 cytoplasmic staining

4-color immunofluorescence imaging: For the images in Figure 2D, two rounds of immunofluorescence (IF) labelling and imaging were performed as described by Micheva et al., (Micheva et al., 2010). Firstly, the cryosections were labelled with Alexa488-conjugated phalloidin (dilution 1/150), an Alexa 555-conjugated anti-GPIIb antibody (dilution 1/300) and primary antibodies against myosin IIA, talin or cortactin (10 μ g/mL in Tris/0.1%BSA/0.05%TWEEN). The sections were then labelled with Alexa 647-conjugated secondary antibodies of the appropriate species. They were mounted in a DAPI-containing medium and examined under a confocal microscope (TCS SP8, objective 63 \times /1.4 oil; Leica Microsystems). Images were obtained of the MK of interest. After this first round of image acquisition, the antibodies were eluted and the sections were reprobed using an anti-FABP4 antibody followed with Alexa 647-conjugated donkey anti-goat secondary antibodies to localize EC. The information from the two acquisition systems was superimposed using ImageJ software to locate MK in close contact with sinusoids.

Structured Illumination Microscopy (SIM)

Serial BM cryosections were labelled as described above and examined under a SIM super-resolution microscope (Elyra PS.1 Zeiss) with a Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27 objectif. 2D Images were captured with a CMOS camera (pixel size: 6,45 x 6,45 μm) on a 1280 x 1280 pixels field. Post-imaging analysis was performed using ImageJ 1.47v and Imaris software (Oxford Instruments). For the 3D tomography analyses using this SIM approach, we followed the F-actin staining within invasive MK protrusions on 8 successive serial sections (up to 2 μm in length) and reconstructed the stack of pictures using Imaris software.

Electron microscopy

Standard electron microscopy: BM samples obtained by flushing mouse femora with 0.1 M sodium cacodylate buffer were fixed in 2.5% glutaraldehyde and embedded in Epon as described in Eckly et al. (Eckly et al., 2012). Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined under a CM120 transmission electron microscope (FEI, The Netherlands). The MK maturation stage classification was: stage (I) the earliest recognizable MKs of 10 to 15 μm in diameter with a large nucleus, (II) cells of 15 to 30 μm in diameter containing platelet-specific granules, and (III) mature MKs, 30-50 μm in diameter, having a well-developed DMS with clearly defined cytoplasmic territories and a peripheral zone (PZ) devoid of organelles. To analyze the MK/EC contacts, MK profiles were recorded at a magnification of x2.500 (overview) and x17.500 (detail). Planar interfaces were defined as any flat MK/EC contact > 5 μm in length (~ half the diameter of a stage I immature MK), short MK extensions as any extension lacking cytoplasmic organelles and in contact with EC showing no deformation, MK protrusions as any extension penetrating below the EC basal plasma membrane, and transmigrating cells as any MK cytoplasmic process emerging into the sinusoid. MK/EC contact was defined as an intercellular distance of ~ 20-50 nm, corresponding to the average distance recognized as a cellular association. In some experiments, the BM cells were permeabilized with 0.02% saponin for 5 min to visualize the cytoskeleton, before fixation in 2.5% glutaraldehyde and embedding in Epon.

For FIB/SEM, samples were prepared as described previously (Eckly et al., 2018). Briefly, BM cells were processed as for TEM and 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, 9.4 nA) at a thickness of 20 nm per section and images were acquired in backscattering mode (3 kV, 1.4 nA). Of note, vertical lines could appear in the FIB-SEM image, known as curtaining (see Figure 3F). This is due to the milled

resin ejected from the block which can redeposit on the block surface, sometimes creating these imaging artifacts. Tomograms and 3D models were computed using Amira 6.2 software (ThermoFischer). The contact areas in the Figure 6Bv were modeled in 3D and exported directly as a 2D binarized stack from Amira software to ImageJ. The surfaces of each contact individually have been determined individually and then averaged it. These quantifications were performed on protrusions from whole MKs analyzed by FIB-SEM (n=3 for each genotypes). Briefly the images underwent a transformation to 8bits and a rotation step with the "reslice" tool followed by a flat 2D projection with "Z project". After thresholding of the contact spots, the number of contacts and their areas were then quantified with the options "Particle analysis" and "ROI manager" and finally exported to Excel for analysis.

For SEM, BM samples obtained by flushing mouse femora were fixed in 2.5% glutaraldehyde, broken open with a scalpel and dehydrated by the routine procedure that involved ethanol and hexamethyldisilazane. Dried samples, marrow side uppermost, were attached to stubs and sputter coated. Secondary electrons were used to image the inner surface of the sinusoids. To ascertain that MKs were located under the imaged surface, the specimen stage was tilted to 52° and exposed to the focused ion beam (such that the plane of the stage was parallel to the ion beam). A cross sectional cut was made (30 kV, 9.4 nAmp) to create a trench that enabled viewing of the cross-section, and backscattered electrons were used to image the new face of the sample in order to identify the MKs.

For immunoelectron microscopy labelling: BM cells were permeabilized with 0.02% saponin for 5 min, fixed in 2% paraformaldehyde and labelled in suspension. The cells were incubated overnight with anti-myosin or irrelevant antibodies (10 µg/mL) followed by 10 nm gold-conjugated secondary antibodies and the samples were embedded in Epon.

Electron tomography: About 300 nm thick Epon-embedded BM sections were stained with uranyl acetate and lead citrate. Single-axis tilt series of selected MKs were recorded using a JEM2100-Plus TEM (Jeol, Japan) equipped with a CEMOS camera (2kx2k) as previously described. The tilt series were acquired using a single-axis high-tilt tomography holder (model 670; Gatan, Munich, Germany) and were aligned with IMOD software (Boulder Laboratory, Colorado).

Correlative light and electron microscopy on cryosections: Cryosections (100 nm thick) were prepared from chemically fixed and sucrose infiltrated BM. They were mounted on formvar carbon-coated grids, immunolabelled as described in the Confocal Microscopy section and

examined under a confocal microscope (TCS SP8). The areas of interest were imaged at x63 magnification using zooms of 0.75 (wide view enabling to locate the region of interest; ROI), 2.5 (view of an entire MK) and 5 (protrusion details). We selected landmarks, e.g., vascular sinuses, which could be used to locate the same ROI. After this first series of image acquisition, the antibodies were eluted as described above and the sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined under a JEM2100Plus transmission electron microscope (Jeol, Japan). Under the microscope, the ROI could be identified by visual inspection. Images were recorded at x 2.500 and x 17.500 magnification and superimposed on IF images using the “picture overlay” software (Jeol).

Multiphoton intravital microscopy.

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of 1.5% Xylazine and 10% Ketamine (10 μ l/g of body mass). A 1-cm incision was made along the midline to expose the frontoparietal skull, while carefully avoiding damage to the bone tissue. The mouse was placed on a custom metal stage equipped with a stereotactic holder to immobilize the head. BM vasculature was visualized by injection of tetra-methylrhodamine dextran (5 μ g/g body weight). Platelets and MKs were visualized by injection of Alexa Fluor 488-labeled anti-GPIX derivative (0.5 μ g/g body weight). Images were acquired at a frame rate of 2 f/min on an upright two-photon fluorescence microscope (Olympus Fluoview Multi photon with 25X aqueous objective) equipped with a \times 25 water objective. FIJI ImageJ Software (Version 2.0) and Photoshop CC 2019 were used to generate movies.

Statistics: All values are reported as the mean \pm SEM. Data were compared by 1-way ANOVA followed by the Mann-Whitney nonparametric test with a threshold of significance of 5%.

Legends to the Supplemental Figures

Figure S1. Ultrastructure of MK in *Yall* mice. (A) Representative TEM images of BM from WT and *Yall* mice. Note the increased number of MK present in *Yall* BM (red arrowhead), Bars: 20 μm . (B) Quantification of the BM MK observed by electron microscopy, per surface unit (s.u., 12,945 μm^2). Bars represent the mean \pm SEM in 3 BM samples (total number of MK counted 99-205). (C) Classification of the MK according to their maturation stage: stage I (presence of granules), stage II (developing DMS not yet organized), stage III (DMS organized in platelet territories). Data are reported as the percentage of the total number of MK. (D) Representative TEM images of the contact interface between MK and EC in *Yall* BM. Left, overview of a fully mature MK attached to the sinusoid; right: detail of the boxed area showing numerous MK extensions. (E) Quantification of the number of MK/EC contacts per square (12,945 μm^2) of the EM grid (116-277 MK analyzed in 3-8 mice). (F) Bar graph representing quantification of the different types of MK/EC contact in all WT and *Yall* MK (stages I to III). Error bars indicate the mean \pm SEM.

Figure S2. Ultrastructure of BM from *Arpc2*^{-/-} mice. (A-C) Mature *Arp2/3*^{-/-} MK exhibited signs of cytoplasmic fragmentation. Cytoplasmic MK extensions (red arrowheads) and isolated platelets were frequently found in the BM outside the sinusoids. Bars: 2 μm in (A) and 10 μm in (B) and (C). (D) At higher magnification, these platelets were similar to circulating platelets. They displayed a discoid shape, had a normal distribution of the open canalicular system (OCS), contained α and δ granules and had a well-defined microtubular margin (MT). Bar: 500 nm.

Movie 1. TEM tomographic video illustrating the fusion of the apical and basal plasma membranes of the EC. Note the hemi-fused intermediate on the EC adjacent to the site of the invasive MK protrusion.

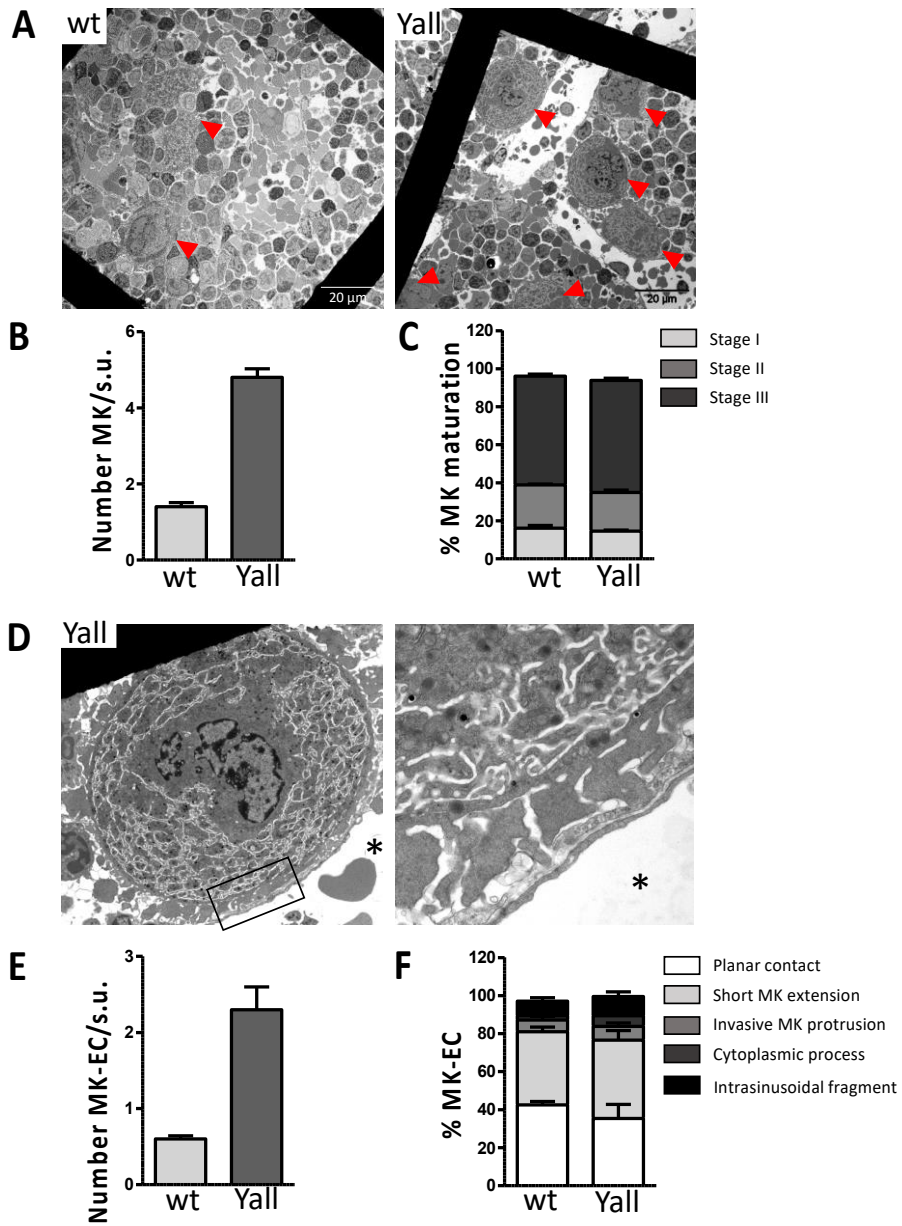
Movie 2. FIB/SEM analysis and 3D reconstruction of an MK/EC interface. The MK extends multiple short extensions, some of which invade the EC and deform the endothelial nucleus (red box). The MK is visualized in orange, the EC in blue, MK/EC contacts in red and its nucleus in grey. The red arrowhead indicates the EC/EC junction. Number of serial images: 1300, dimension: X=28 μm , Y=24 μm , Z=26 μm .

Movie 3. Representative time lapse video (z-projection) recording WT mouse with MKs extending an elongating proplatelets (green, labeled with AF-488 anti-GPIX antibody derivative) within bone marrow sinusoids (red, AF655-conjugated dextran).

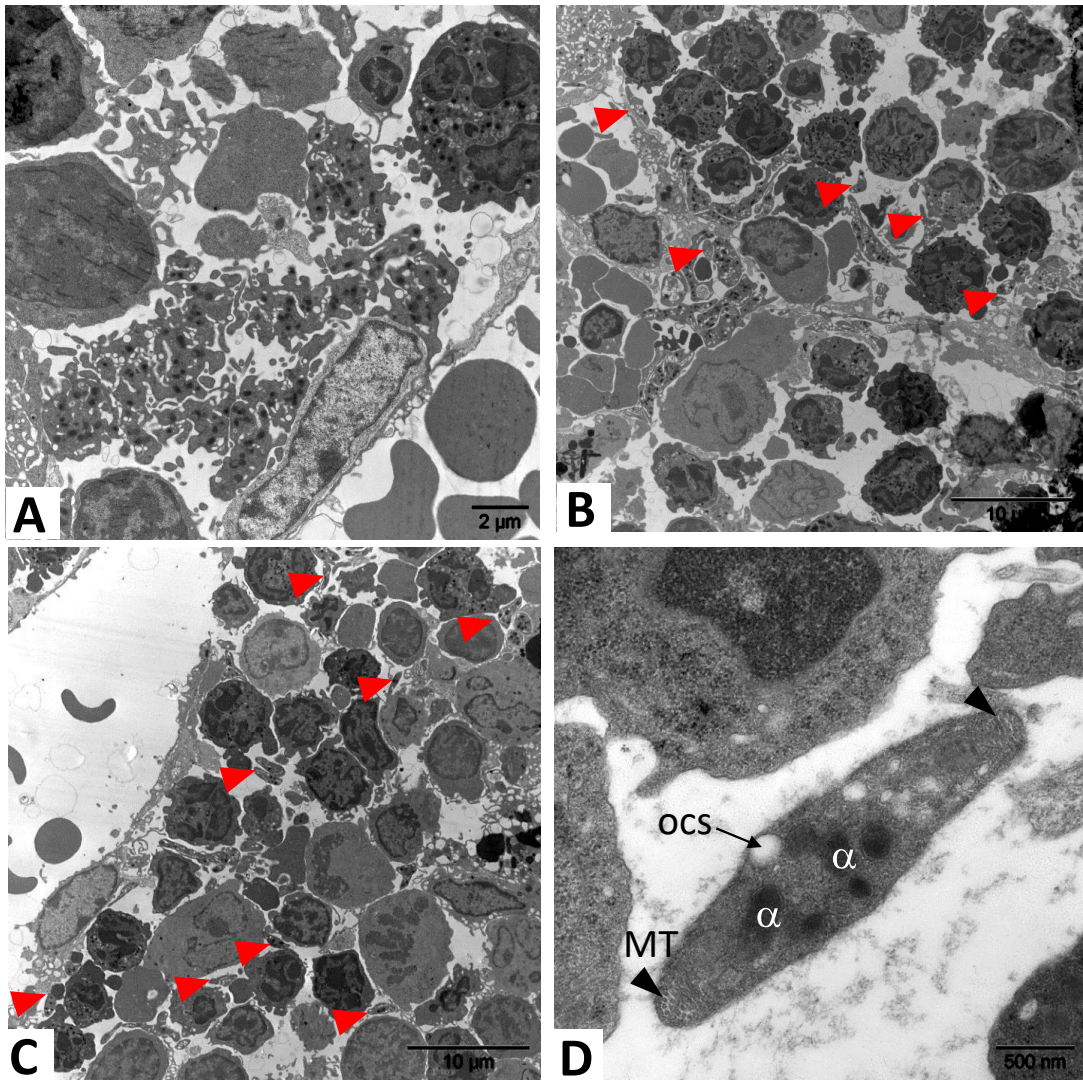
Movie 4. Representative time lapse video (z-projection) recording *Arp2/3*^{-/-} mouse with MKs close to sinusoids (green, labeled with AF-488 anti-GPIX antibody derivative) within bone marrow sinusoids (red, AF655-conjugated dextran).

Movie 5. FIB-SEM analysis and 3D reconstruction of a transmigrating WT MK extruding a large portion of its cytoplasm into the sinusoidal lumen. This occurs through a single transmigration site at some distance from the next EC/EC junction. The MK is visualized in orange and the EC in blue. Number of serial images: 1600, dimension: X=28μm, Y=28μm, Z=32μm.

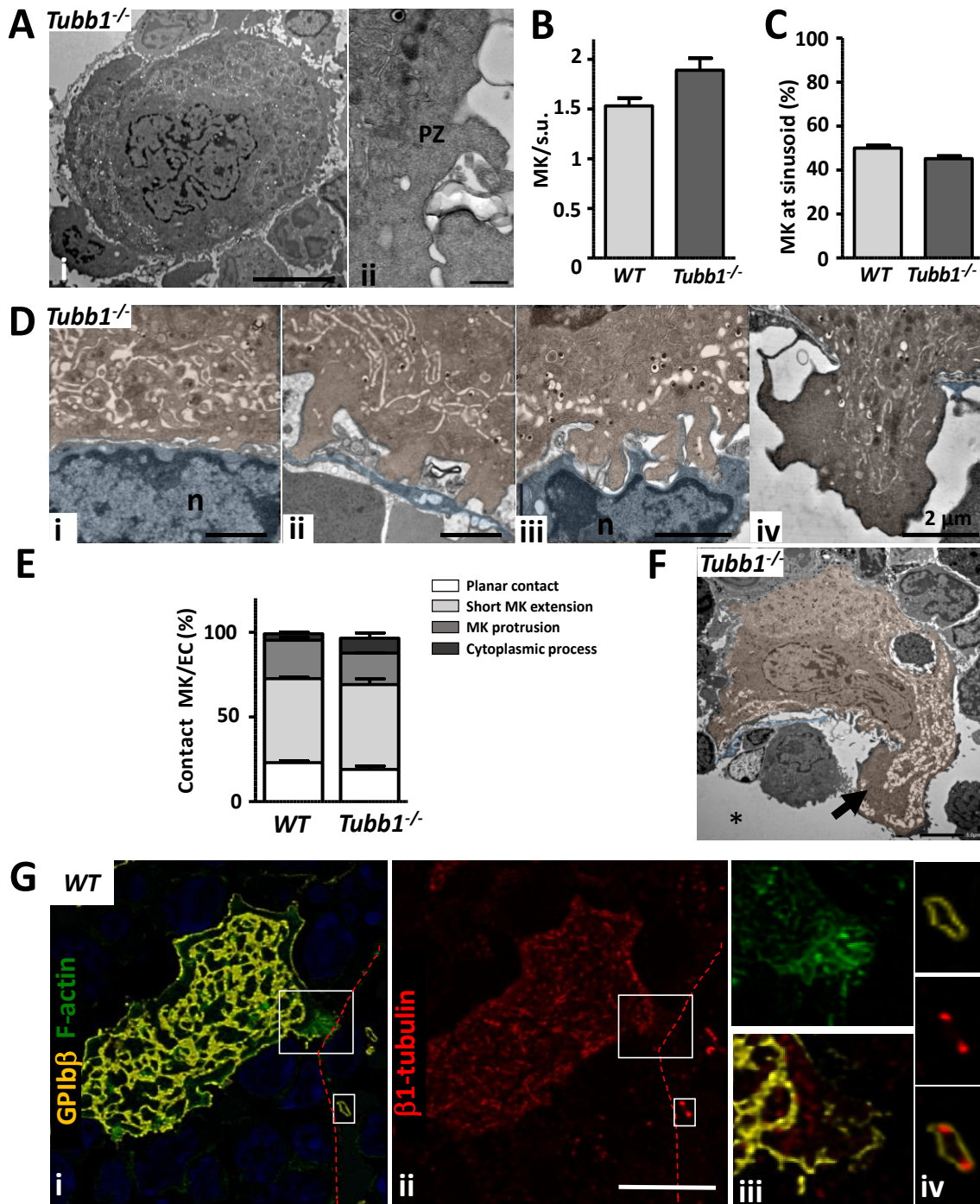
Movie 6. FIB-SEM analysis and 3D reconstruction of a transmigrating *Myh9*^{-/-} MK extending numerous cytoplasmic processes into the sinusoidal lumen. This occurs through multiples smaller transendothelial pores. The MK is shown in orange and the EC in blue. Number of serial images: 1500, dimension: X=28μm, Y=28μm, Z=30μm.



Suppl Figure S1



Suppl Figure S2



Supplemental figure S3. β 1-tubulin is dispensable for MK intravasation.

(A) Representative TEM images showing that (i) mature *Tubb1*^{-/-} MKs have an abnormal appearance with (ii) the presence of a peripheral zone. (B) Quantification of the number of MKs observed by electron microscopy, per surface unit (s.u., 12,945 μ m²) of BM, showing no significant difference in the density of *Tubb1*^{-/-} MKs. Bars represent the mean \pm SEM in 3 BM samples, for a total number of 178 MKs counted. (C) Quantification of the MKs associated with sinusoids, showing a normal perivascular localization of *Tubb1*^{-/-} MKs. Bars represent the percentage of MK at the sinusoid relative to the total number of MKs counted (84 < n < 138). (D) Ultrastructural details of *Tubb1*^{-/-} MK/EC contacts including (i) planar contacts, (ii) short MK extensions, (iii) invasive MK protrusions and (iv) transmigrating MK fragments. Bars: 2 μ m. (E) Quantification of the different types of contact between mature MKs and ECs in WT and *Tubb1*^{-/-} BM. Planar contacts appear in white, short extensions in light grey, invasive protrusions in dark grey and transmigrating cytoplasmic processes in black. (F) Representative TEM image of a large intravascular cytoplasmic *Tubb1*^{-/-} MK process (arrow) *indicates the sinusoidal lumen. Bar: 5 μ m. (G) Cryosections of BM from WT mice were stained with an anti-GPIIb β mAb (to detect MK, yellow), phalloidin-488 (to detect F-actin, green), an anti- β 1-tubulin mAb coupled to Alexa 647 (red) and DAPI (blue). (i-ii) Confocal images of an MK in contact with a sinusoid. (iii) A higher magnification of the invasive protrusion (large boxed area in i) showing that β 1-tubulin does not colocalize with F-actin. (iv) A higher magnification of a circulating platelet (small boxed area in i) showing β 1-tubulin staining of the marginal band in a transverse section. Dotted red line, EC, bars: 10 μ m.

3. Résultats supplémentaires

L'ensemble de ce travail suscite de nouvelles pistes de réflexion : 1. Les microtubules interviennent-ils dans la formation des podosomes ? 2. Compte tenu que les MKs des souris Arp2/3 sont incapables de transmigrer en raison de leur inefficacité à former des podosomes, d'où proviennent les plaquettes circulantes dans ces souris ? 3. Quel est le rôle des podosomes périphériques n'interagissant pas directement avec les sinusoides ? Ces points sont abordés ci-dessous.

3.1. Rôle des microtubules : Etant donné le rôle essentiel des microtubules dans la biogénèse des plaquettes, et en particulier dans l'élongation des proplaquettes, on peut se demander si ce cytosquelette participe également au développement des podosomes. Pour répondre à cette question, nous avons tout d'abord recherché la présence de microtubules dans les *in vivo*-MK podosomes. Nos analyses *in situ* par microscopie électronique et par immunofluorescence ciblant la tubuline $\beta 1$ ne révèlent pas la présence de microtubules ou de tubuline $\beta 1$ dans ces structures. (Figure supplémentaire S3). En parallèle, nous avons mis à profit un modèle murin déficient pour la tubuline $\beta 1$, l'isotype de tubuline majoritaire dans les MKs et qui présente la particularité de n'être exprimé que dans la lignée mégacaryocytaire. Ces souris présentent une macrothrombopénie sévère avec des plaquettes sphériques et leurs MKs sont incapables de former des proplaquettes *in vitro*¹²⁷. Nous n'avons pas observé d'anomalies dans l'intravasation des MKs (contact, formation des protrusions, pénétration de l'endothélium). Par conséquent, l'ensemble de ces résultats suggèrent que **les microtubules ne sont pas essentiels à la formation des *in vivo*-MK podosomes**. Ces résultats ont été présentés lors d'une **communication orale à l'ISTH de Melbourne en 2019**. La question qui demeure néanmoins est de savoir si les microtubules pourraient intervenir dans la maturation des podosomes. Cela a notamment été démontré dans d'autres modèles cellulaires tels que les ostéoclastes, les macrophages et les cellules cancéreuses^{298,317,320,321,379,380}. Un mécanisme de régulation des podosomes par les microtubules pourrait faire intervenir les protéines de la famille KANK capables d'interagir à la fois avec la taline et les microtubules, et les myofibrilles de myosine IIA dépendante de Rho-GEF-H1³⁸¹. Il pourrait ainsi exister un lien structural et fonctionnel entre le réseau de microtubules et l'actomyosine de la zone périphérique.

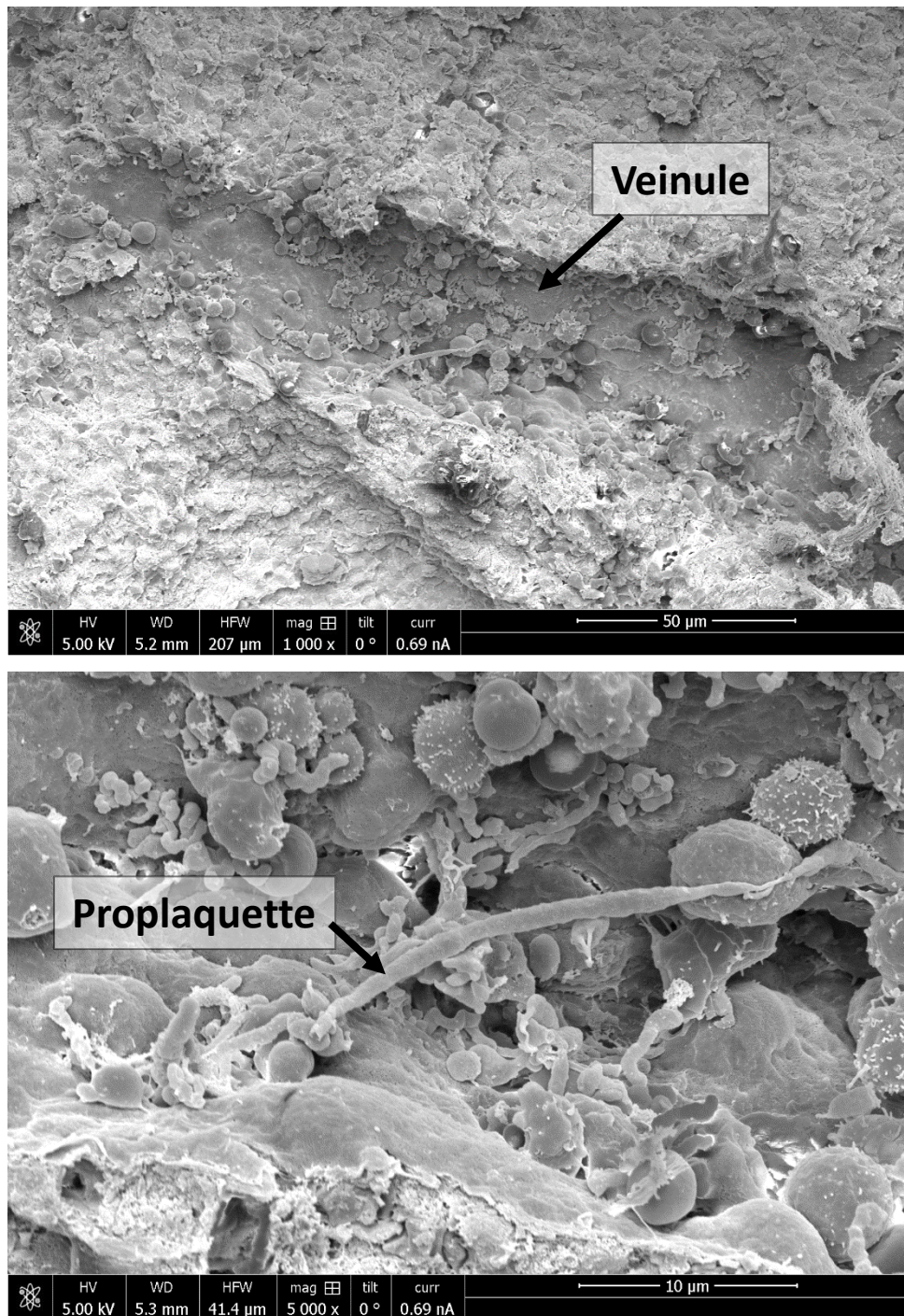


Figure S4. Les sinusoides de la rate sont fenêtrés et pourraient permettre l'émission directe de proplaquettes.

Images de microscopie électronique à balayage montrant une veinule de rate (en haut), celle-ci comporte de nombreuses ouvertures permettant la libération de proplaquettes (en bas).

3.2. Intravasation des MKs dans la rate : Bien qu'incapables de former des podosomes, les MKs des souris *Arp2/3* génèrent des plaquettes circulantes (numération plaquettaire diminué de moitié) interrogeant sur l'existence d'un autre mécanisme d'intravasation non médié par les podosomes. Une piste possible est de considérer la rate, un autre organe hématopoïétique de la souris, dans laquelle les mécanismes de transmigration des MKs pourraient être distincts de ceux observé dans la moelle. Sachant d'une part que les sinusoides spléniques sont largement fenêtrés³⁸² et que, d'autre part, le nombre de MKs localisés dans la rate est augmenté de 2 fois dans la souris *Arp2/3*^{-/-366}, une hypothèse serait une production plaquettaire d'origine splénique. Nous avons analysé la rate de ces souris par microscopie électronique à balayage. Cette approche d'imagerie offre la possibilité d'investiguer un grand volume de l'échantillon (et ainsi augmenter les chances de repérer des événements d'intérêt) et possède la résolution nécessaire pour suivre/détecter les proplaquettes. Nous avons ainsi détecté la présence de proplaquettes dans la microcirculation splénique de ces souris suggérant la possibilité d'une transmigration des MKs podosome-indépendante (via les ouvertures pré-existantes ?) dans cet organe ([Figure supplémentaire S4](#)). De façon intéressante, cette observation ouvre de nouvelles perspectives de vision d'**adaptation des mécanismes d'intravasation des MKs selon le type d'environnement avec lequel il est en contact**.

3.3. Fonctions des podosomes périphériques : L'étude de l'organisation du cytosquelette d'actomyosine révèle **l'existence de deux populations de podosomes au sein du même MK** : le podosome que l'on retrouve en contact avec le sinusoides qui a pour fonction de perforer l'endothélium et le podosome périphérique, plus court, dont le rôle est méconnu ([Figure supplémentaire S5A-B](#)). Une fonction possible pour ces derniers, déjà évoquée dans la littérature pour d'autres cellules²¹⁴, serait d'explorer et de scanner le microenvironnement. En effet, les podosomes sont des structures très dynamiques avec des phases de protrusion et de rétraction rapides qui permettent aux cellules de sonder leur environnement. Pour évaluer cette hypothèse, nous prévoyons d'étudier la demi-vie des podosomes de MKs déposés sur différentes surfaces (monocouche de cellule endothéliale, lamelles recouvertes de gradients de protéines adhésives). Pour cela, nous disposons au laboratoire de souris transgéniques GFP-myosine ayant des podosomes fluorescents dans les MKs (Collaboration D. Vignevic, Institut Curie, Paris) ([Figure supplémentaire S5C](#)). En résumé, cette étude révèle

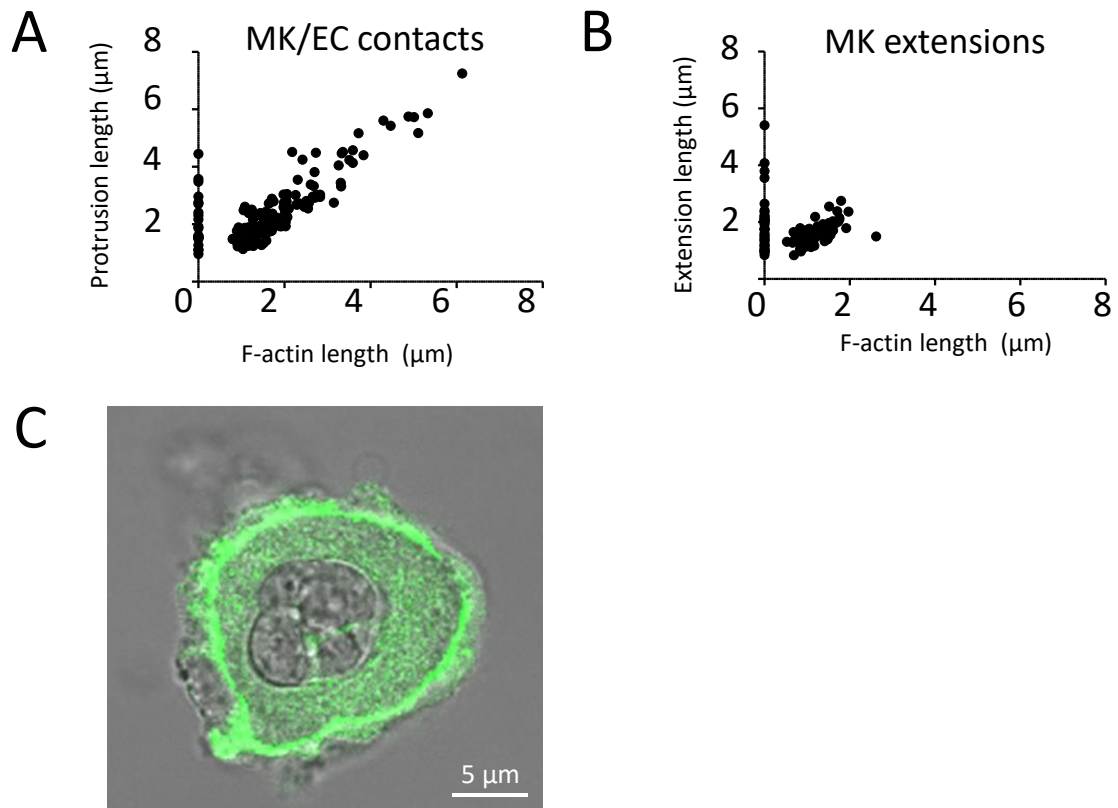


Figure S5. Les podosomes issus de la podopZ sont plus longs lors des contacts avec l'endothélium.

A)(B) Mesures de la longueur des protrusions et de la longueur de la F-actine dans les protrusions de MKs en contact avec les cellules endothéliales (A) ou distants des CE (B). Les plus longues protrusions enrichies en actine ne sont présentes que dans les zones de contact MK/cellule endothéliale (n=267 protrusions sur 18 MKs en contact avec les sinusoides). (C) Image de microscopie à contraste de phase et à épifluorescence montrant la podopZ d'un MK issu de souris Myosine-GFP.

que le MK possède deux types de podosomes qui pourraient correspondre à des degrés de maturation différents, concept cité dans les modèles cancéreux (Cf. chapitre 4.2.3 de la revue bibliographique) et pouvant être lié à des fonctions spécifiques tel que cela a été rapporté pour les macrophages (Cf. chapitre 4.2.3 de la revue bibliographique).

Axe 2. Évaluer le rôle des intégrines dans le passage des MKs au travers l'endothélium

1. Résumé de l'étude

Les propriétés des intégrines, en particulier leurs capacités : 1) à permettre l'adhésion des cellules à leur environnement, 2) à s'associer aux filaments d'actine pour stimuler leur organisation et ainsi induire la formation de projections cellulaires et 3) leur présence dans les podosomes, nous amènent à nous demander si ces récepteurs sont impliqués dans l'intravasation des MKs. Pour cela, nous avons analysé le comportement de **MKs de souris doublement déficientes en intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$** (DKO *Itgb1*^{-/-}/*Itgb3*^{-/-} spécifique de la lignée MK) au cours des différentes étapes de l'intravasation (**Manuscrit en cours de rédaction**).

Nous avons démarré notre étude par l'analyse de la moelle osseuse par microscopie électronique, et avons observé que les MKs des souris DKO présentent un défaut de maturation caractérisé par un DMS désorganisé et contiennent des neutrophiles, un processus appelé empériplèse (Cf. paragraphe 1.2.3 de la revue bibliographique). De façon surprenante, au cours de ces observations, nous avons également constaté la présence de MKs entiers dans la lumière des sinusoides des souris DKO. Ceci a été confirmé par l'augmentation des événements de transmigration quantifiée par microscopie confocale sur coupes épaisses de moelle fixée, et par l'observation dynamique du passage de MKs entiers par microscopie intravitale. Le passage de MKs entiers n'est pas observé dans les souris contrôles. En accord avec ces résultats, nous avons noté la présence de noyaux polylobés mégacaryocytaires dans la microcirculation des poumons des animaux DKO. Ces premiers résultats démontrent que les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ limitent le passage de MKs entiers vers la circulation sanguine. Sur ce dernier point, nous savons que l'intravasation accrue des MKs DKO n'est pas due à une augmentation de la taille des pores transendothéliaux, impliquant d'autres mécanismes cellulaires. L'ensemble de ces résultats démontrent que **les intégrines régulent négativement l'intravasation des MKs**. Trois hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces données : 1) l'absence d'intégrines conduit-elle à un défaut d'ancrage du MK dans son microenvironnement, facilitant ainsi sa transmigration ? 2) les mécanismes de franchissement de la barrière endothéliale médiés par les podosomes sont-ils impactés dans les souris DKO ? et/ou le noyau du MK est-il plus facilement déformable en absence d'intégrines, s'insérant ainsi plus facilement dans les pores transendothéliaux ?

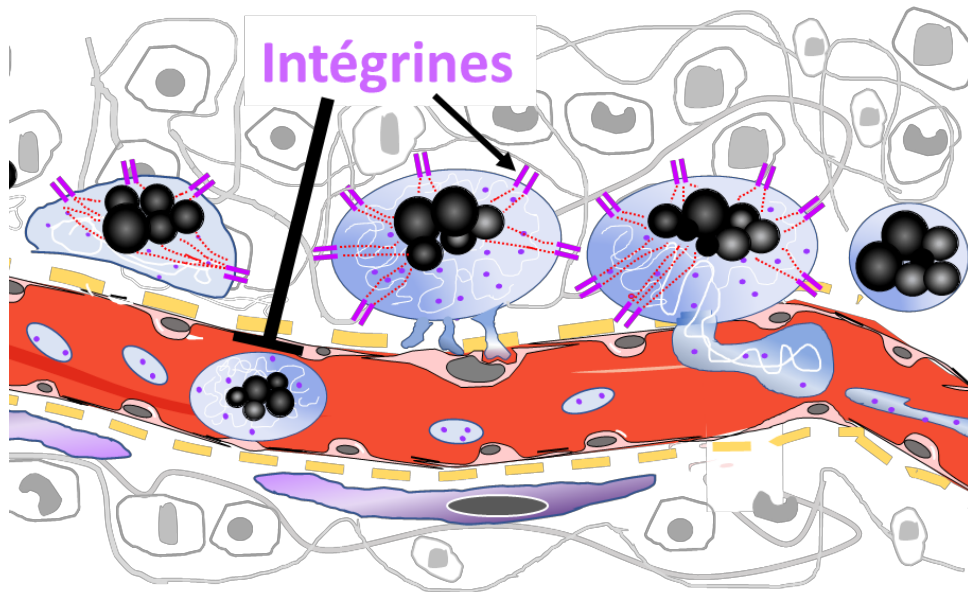
Afin d'explorer la première piste d'un défaut d'ancrage, nous avons d'abord voulu savoir si les intégrines interviennent dans l'attachement des MKs dans la moelle dans des souris contrôles. Des études de co-marquage de l'intégrine $\beta 1$ activée (visualisée grâce à l'utilisation de l'anticorps 9EG7) et de la fibronectine révèlent la présence de plaques d'adhérence tout autour des MKs. Dans les souris *Itgb1^{-/-}/Itgb3^{-/-}*, ces sites d'adhérences sont inexistantes suggérant que les MKs soient moins ancrés à leur environnement. Des études d'adhésion statique sur différents substrats confirment qu'en absence d'intégrines les MKs ne s'étalent pas. Le modèle ex vivo d'explants de moelle osseuse nous a permis de quantifier le nombre de MKs se détachant de la périphérie du tissu. Nos résultats indiquent une tendance à l'augmentation de l'émigration des MKs *Itgb1^{-/-}/Itgb3^{-/-}* en comparaison aux MKs témoins. D'autres analyses de (trans)migration de MKs utilisant des chambres de Dunn et de Boyden sont actuellement en cours d'étude. Quoiqu'il en soit, ces résultats suggèrent que **les intégrines participent à la rétention des MKs au niveau de l'environnement médullaire.**

Après avoir établi que les intégrines sont localisées dans les podosomes des MKs, nous avons cherché à savoir si elles contribuaient à leur formation. Pour cela, nous avons utilisé les souris *Itgb1^{-/-}/Itgb3^{-/-}* et avons analysé les podosomes des MKs 1) *in vitro* sur différents substrats (taille, densité, cellules formant les podosomes, capacité de protéolyse) et 2) *in situ* en contact avec les sinusoides dans la moelle osseuse de souris. Notre conclusion principale est que **les intégrines ne sont pas nécessaires à la formation des podosomes et à leur fonction de perforation de l'endothélium.**

Nous nous sommes ensuite intéressés à la possibilité que les intégrines contrôlent les propriétés biophysiques du noyau. Pour répondre à cette question, nous avons caractérisé la morphologie (taille, forme) des noyaux en analysant des coupes de moelle marquées avec du Hoechst. Il apparaît que les noyaux des MKs *Itgb1^{-/-}/Itgb3^{-/-}* présentent une configuration dépliée, occupant ainsi un volume plus important dans la cellule. En raison du rôle joué par les lamines sur les propriétés des noyaux, nous sommes actuellement en train d'évaluer l'impact de la délétion des intégrines sur l'expression des lamines A/C et B1. Nos premiers résultats laissent entrevoir une répartition anormale de la lamine A/C au niveau de la membrane nucléaire (impliquée dans la rigidité du noyau), sans affecter celle de la lamine B1 (impliquée dans l'intégrité des noyaux). Ces études qui semblent indiquer que **les intégrines jouent un rôle dans le maintien structural du noyau** des MKs demandent à être approfondies.

Nous poursuivons actuellement ces travaux en développant des chambres de déformabilité afin d'analyser la capacité des noyaux à se faufiler au travers de pores calibrés²⁷⁵.

Cette étude est présentée sous la forme d'un **manuscrit en cours de rédaction** qui sera complété selon les résultats obtenus sur les propriétés biophysiques des noyaux.



2. Manuscrit en cours de rédaction

Integrins prevent the passage of entire megakaryocytes into the circulation by ensuring their bone marrow attachment and their nuclear shape

Scandola C¹ *et al.*

¹Université de Strasbourg, INSERM, EFS Grand Est, BPPS UMR-S 1255, FMTS, F-67065 Strasbourg, France, ²Université de Strasbourg, CNRS, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR 7178, Strasbourg, France

Correspondance to:

Anita ECKLY

UMR-S1255 INSERM-Université de Strasbourg

Etablissement Français du Sang-Grand Est

10, rue Spielmann, B.P. N°36

67065 Strasbourg Cedex, France

anita.michel@efs.sante.fr

Tel: (33) 388 21 25 25

Fax: (33) 388 21 25 21

Background: Thrombopoiesis requires the orchestrated passage of megakaryocytes (MKs) from the bone marrow, an adhesive environment rich in matrix proteins, into the bloodstream, raising the question of the role of adhesive receptors in this process.

Objective: We evaluated the role of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins, the two members expressed by MKs, in the final stages of megakaryopoiesis, i.e. MK passage across the sinusoid wall, using mice lacking both $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins (DKO) in the MK/platelet lineage.

Results: *In situ*, bone marrow DKO MKs displayed an abnormal demarcation membrane system and emperipolesis. Remarkably, electron microscopy also revealed the presence of entire DKO MKs inside the vascular lumen of sinusoid. This was confirmed by immunofluorescence on fixed BM thick sections and by dynamic intravital 2-photon microscopy. Accordingly, large polyploid MK nuclei were found in the downstream pulmonary microvessels of these mice. Transmigration of entire DKO MKs did not result from an increased size of endothelial pores, indicating other mechanisms. Podosomes formation and their invasive properties were not affected in these mice. However, DKO MKs plated on fibronectin and fibrinogen displayed a round shape compared to spread control MKs suggesting weaker adhesive properties of these cells. In the absence of integrins $\beta 1$ and $\beta 3$, we also found that the polylobulated nuclei were larger with an unfolded appearance and have an abnormal nuclear distribution of lamin A/C, the nuclear protein known to contribute to nuclear stiffness. This indicates that integrins regulated the shape and physical properties of the nucleus of mature MKs.

Conclusion: These findings demonstrate that integrins act as negative regulators of the MK passage into the blood circulation by ensuring via nuclear properties, in addition to their established role in modulating adherence.

INTRODUCTION

Megakaryocytes (MKs) are giant cells of the bone marrow (BM) which play an essential role in generating 10^{11} blood platelets every day. To produce platelets, MKs undergo a stepwise differentiation process that takes place in the bone marrow environment [1]. This includes endomitosis leading to a large polylobulated nucleus, the synthesis of platelet-specific granules and the development of an extensive demarcation membrane system (DMS) which functions as a reservoir for the plasma membrane of future platelets [2]–[5]. Upon maturity, MKs extend pseudopod-like cytoplasmic projections, called proplatelets, through the endothelium into the sinusoid lumen where they are shed and processed into platelets [4]–[6]. A more recent model has been proposed whereby platelet biogenesis may also be the result of individual platelets budding off from the MK periphery [7]. During terminal differentiation, the nucleus separates from the extended mass of cytoplasm, and is surrounded by a narrow rim of cytoplasm and an enveloping plasma membrane. These pyrenocytes (nuclei surrounded by plasma membrane) remain in the hematopoietic bone marrow compartment where they are phagocytized [8]. Although this may be the dominant mode of thrombopoiesis, several studies showed that intact MKs can occasionally enter the circulation, circulate through the lungs where they dynamically release platelets [9]–[11].

The successful extension of proplatelet arms across the endothelial lining requires the fine regulation of MK interactions with the surrounding microenvironment. To enter into the circulation, MKs must cross a continuous endothelial barrier [12]–[14]. We have recently shown that they use podosome-like invasive protrusions to generate transendothelial pores allowing the extension and release of proplatelets into the circulation [14]. Podosomes are actin-based dynamic protrusions of the plasma membrane typically present at sites where the cells adhere to the extracellular matrix (ECM) and they also mediate matrix degradation [15]. *In vitro* studies have shown that podosomes in MKs can degrade the ECM and this process has been predicted to have a pivotal role in ECM remodeling and MK-sinusoid interactions [16]. Several proteins implicated in the actin cytoskeleton organization have been linked with defects in MK podosome formation. They comprise the Wiskott-Aldrich syndrome protein WASp [17], the Arp2/3 complex [18], the degranulation-promoting adaptor protein ADAP [19], the actin-bundling protein L-Plastin [20], the phosphoinositide-dependent protein kinase-1

[21] and Cdc42 [22]. Missing from this list are the integrins which are known to participate in the formation and dynamics of podosomes in many cell types.

$\beta 1$ et $\beta 3$ integrins are the two forms expressed by MKs and their role in platelet biogenesis is still incompletely understood [23], [24]. Several studies indicate that integrins have little or no impact on platelet count, as found in Glanzmann thrombasthenia patients with mutations in integrin $\alpha IIb\beta 3$ genes and in knockout mice lacking $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins [25]–[28]. On the other hand, gain-of-function mutations in the genes of αIIb and $\beta 3$, defects in the DMS and proplatelet formation have been documented, resulting in defective thrombopoiesis [29], [30]. Proplatelet formation has also been reported to be negatively regulated by $\beta 1$ integrin family members through the Rho/ROCK pathway [17]. Recent data proposed a pivotal role of $\beta 1$ integrin glycosylation in proper MK localization at the sinusoids and in the formation of the DMS [31]. In a myelofibrosis context, dysregulation of the fibronectin-integrin $\alpha 5\beta 1$ axis contributes to the expansion of the bone marrow megakaryocytosis and fibrosis in JAK2V617F transgenic mice [32]. Hence, the question of the effective contribution of integrins to platelet formation remains open.

In the present study, we evaluated the role of $\beta 1$ et $\beta 3$ integrins in MK transmigration using double knockout mice lacking $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins in the MK/platelet lineage. We found that $\beta 1/\beta 3$ integrin double deficiency in MKs result in a striking transmigration of intact MKs into the BM sinusoids *in vivo*. We propose that this atypical process was linked to defective MK anchoring to surrounding ECM and to abnormal ECM organization. In addition, we show that integrins also control the nucleus architecture, likely affecting its physical deformability. These findings highlight a role of integrins in platelet biogenesis by influencing MK transmigration *via* modulating both MK adherence and nuclear physical properties.

MATERIAL and METHODS

Animals. Four transgenic mouse lines were used 1. Double KO mice in $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins (DKO), single KO *Itgb1*^{-/-}, single KO *Itgb3*^{-/-} and control mice of C57BL/6J genetic background. The single KO mice were generated by crossing *Itgb1* flox/flox or *Itgb3* flox/flox mice from the laboratories of R. Fässler (Basel, Switzerland) and K. Weilbaecher (Saint Louis, USA) and control mice from the C. River (L'Arbesle, France). Inactivation of integrin-encoding genes occurs through the cre/lox system under the control of the PF4 (Platelet factor 4) promoter. *Itgb1*^{-/-}/*Itgb3*^{-/-} double KO mice (DKO) are crosses of the two single KO lines. To establish that gene disruption resulted in a loss of expression of proteins, western blots were performed confirming that expression of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins was lost in platelets (unpublished data, C. Leon). DKO mice had a 35% reduction in platelet count (mean: 663866 \pm 85851 platelets/ μ L versus 1013000 \pm 40186 platelets/ μ L for the control, n=12-15 mice). All mice were bred in a specific pathogen free facility at the Etablissement Français du Sang-GEST in Strasbourg and all animal experiments were approved by the local ethics committee.

Reagents and antibodies. BSA, Saponin, Triton X-100, were from Sigma-Aldrich (Rueil-Malmaison, France). The goat anti-rabbit and anti-mouse, DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole, dilactate), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin, streptomycin, and glutamine were from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Goat anti-rabbit immunoglobulin (Ig) conjugated Alexa Fluor 555 was from Thermo Fisher Scientific (Saint Aubin, France), goat anti-rat Ig conjugated cyanine 2 was from Jackson ImmunoResearch Labs (Suffolk, United Kingdom). Monoclonal antibody against mouse glycoprotein GPIIb β (RAM.1-488, RAM.1-647) and monoclonal antibody against mouse α IIb β 3 (RAM.2) were produced and labeled in our laboratory [33]. Round culture dishes coated or uncoated with ESS 28kPa were from Ibidi (Martinsried, Germany). M11 Cl-huMEC human dermal microvascular endothelial cell line was from Inscreenex (Braunschweig, Germany).

Confocal microscopy. For the analysis of podosome localization and distribution, a single-cell suspension of tibia and femur wt or DKO BM was prepared by flushing the bones with PBS followed by type I collagenase 2.3 mg/ml for cell isolation and resuspension. Resuspension was performed by incubation at 37 °C for 5 min followed by vortexing. The supernatants were collected and collagenase stopped by adding v/v DMEM-1%PSG-10% FCS. BM were incubated a further 5 min for a second run in collagenase for complete cell isolation. Total cell suspension of supernatants in DMEM-1%PSG-10% FCS were then centrifuged at 1400 RPM and

resuspended in 2 mL of DMEM-1%PSG-10% FCS containing 100 nM Sir-Actin. For podosomes analysis, ibidi 35 mm microdishes were coated with human fibrinogen (100 µg/ml), human plasma fibronectin (100 µg/ml) overnight at 4°C, blocked with HSA (10 mg/ml) for 30 min and washed with PBS before use. In some experiments, human dermal microvascular endothelial cells (M11) were cultured for 24 hours to form a confluent monolayer (Cl-huMEC, Inscreenex). MKs freshly isolated from the BM were incubated for 3 or 6 h on the indicated substrate and non-adherent cells were removed with PBS. Adherent MKs were fixed in PFA 4% and stained with anti-GPIIb/IIIa and DAPI. For MK-endothelial cell interaction studies, isolated MKs were incubated for 3h and 6h over a confluent layer of cultured human dermal microvascular endothelial cells (M11), and stained as described above. Podosomes localization and organization were analyzed by confocal microscopy (SP8 Leica, 63x) for GPIIb/IIIa⁺ cells. The percentage of podosome-containing MKs were quantified on at least 12 MKs from 3 mice from each genotypes. The number of podosomes per µm² was calculated with the ImageJ software on at least 36 MKs/ experiments (n=3 wt and n = 3 DKO for each indicated substrates).

For the analysis of activated β1 integrins and ECM distribution, BM from wt and DKO were fixed in a mix of 2% paraformaldehyde-0.2% glutaraldehyde, and frozen in liquid nitrogen as described [3]. Cryosections of 250 nm thickness were cut and labelled with an Alexa568-conjugated anti-GPIIb/IIIa antibody, an endothelial marker (FABP4, 3 µg/ml) and primary antibodies against β1 or β3-integrins (MB1.2 and Luc.A5, at 3 µg/ml), or activated β1 integrin (9EG7, at 10 µg/ml), or fibronectin (ab2413), or fibrinogen (A0080). The sections were then labelled with Alexa488 Donkey anti-Goat for FABP4 staining, and with Alexa647 or Alexa680-conjugated secondary antibodies of the appropriate species for integrins and matrix staining and DAPI. They were examined under a confocal microscope (TCS SP8, Leica). No fluorescence was detected with isotype-specific control IgG.

Confocal analysis of thick bone marrow sections for transmigration quantification and nucleus volume measurements was performed according to an adaptation of the method described by Coutu *et al.* [34]. Briefly, 250 µm thick vibratome BM and lung sections from 4% paraformaldehyde (PFA) fixed femurs were incubated with FABP4 (3 µg/ml, overnight) followed by Alexa 568-conjugated anti-GPIIb/IIIa antibody (RAM.1-568; 10 µg/ml) and Alexa488 Donkey anti-Goat for FABP4 staining overnight and by DAPI counterstaining (1/36000, 10 min). For analysis of nucleus, the BM and lung sections were counterstained with Hoechst

staining (1/1000, 10 min). The fluorescently labeled BM tissue was placed cut-face down into incubation chambers and mounted with Mowiol mounting solution. BM and lung samples from 3 mice were examined. The BM tissue beneath the bone edge was located and positioned using differential interference contrast (DIC) illumination. Series of x-y-z images of typically 193,75*193,75 μm x-y size were collected along the z-axis at 1 μm step size through 30-50 μm of BM tissue, using the 40x objective from a Leica SP8 confocal microscope. For quantitative analysis of nucleus number in the lung, samples from 3 different mice were examined. For the nucleus volume analysis, the fluorescence was delineated on Z-stack of whole MKs (z-size 1 μm) using the Amira software. Six cells were included in each MK stage and the results were expressed as a mean \pm SEM.

For the confocal analysis of lamin localization, native wt and DKO MKs were cytopun onto poly L-lysine-coated slides. The cells were then permeabilized with 0.1% triton-X100 in PBS containing 1% BSA followed by incubation with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of AF488-labeled anti-lamin antibody. The slides were mounted in Prolong gold with Dapi for examination under a SP8 confocal microscope (Leica Microsystems, France) and observations have been made on Z-stacks (z-size 0.5 μm).

Electron microscopy. For Transmission electron microscopy, BM was fixed in 2.5% glutaraldehyde and embedded in Epon as described [35]. Transversal thin sections of the entire BM were cut and examined under a CM120 TEM (FEI).

For SEM, native BM MKs were allowed to adhere to a surface coated with fibronectin, fibrinogen or endothelial cells, and after gentle agitation to detach non-adherent cells, the remaining adherent cells were fixed in 2.5 % glutaraldehyde, dehydrated, attached to stubs, sputter coated and examined under a Helios NanoLab microscope at 5kV (ThermoFisher, Eindhoven, The Netherlands) as described [14]. Secondary electrons were used to image the shapes of the MKs.

Flow cytometry. For the ploidy analysis of the native MKs, mouse femurs, tibiae and iliac crests were harvested, cut in small fragments and incubated in a PBS-collagenase-dispase mix (respectively at 3 mg/mL and 4 mg/mL, 5mL/mouse) for 30 min at 37°C. Then, the tube is filled with PBS-2%NCS to stop the collagenase and the supernatant is 70 μm filtered to eliminate bones fragments. After red cell lysis, the freshly isolated bone marrows are washed in PBS-2% NCS and stained with anti CD41 and anti CD42c antibodies and Hoechst. Anti Gr-1, B220, F4/80

and TER119 probes were used as a negative control to respectfully exclude granulocytes, B lymphocytes, macrophages and erythrocytes from the total bone marrow suspension. The freshly isolated MKs are identified as a CD41/CD42c positive cell population and ploidy analysis was performed using Hoechst 33342.

MK emigration from bone marrow explants. Preparation of BM explants was performed as previously described [36]. Briefly, BM from femur wt or DKO mice were flushed with Tyrode's buffer (0.137 M NaCl, 2.68 mM KCl, 11.9 mM NaHCO₃, 0.4 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, 0.35% BSA, at pH = 7.3). Ten 0.5 mm thick sections of marrow were placed in an incubation chamber containing Tyrodes's buffer with 5% mouse serum. Chambers were maintained in a 5% humidified CO₂ atmosphere at 37 °C for 6h. MKs at the periphery of the explants were counted under an inverted phase contrast microscope coupled to a video camera (DMI8 Leica microscope, 40x objective). A motorized multiposition stage (in x, y, z) was used, and an average of 100 stages positions showing MKs were followed. Results are expressed as the number of total emigrating MKs at the indicated time-points. In each case, a minimum of six independent experiments (i.e. with femurs from four different mice) were performed. When examining the effects of blocking antibodies, one experiment was simultaneously performed with femurs from the same mouse in the presence of irrelevant antibody. Mice from each genotypes were analyzed and image acquisitions were performed in a blinded manner.

Statistics. All values are reported as the mean ± SEM. Statistical analyses were performed with PrismGraphpad software (La Jolla, CA, USA). Data were compared by t-test, 1-way ANOVA or 2-way ANOVA followed by Bonferroni post-test with a threshold of significance of 5%. P-values <0.05 were considered statistically significant. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

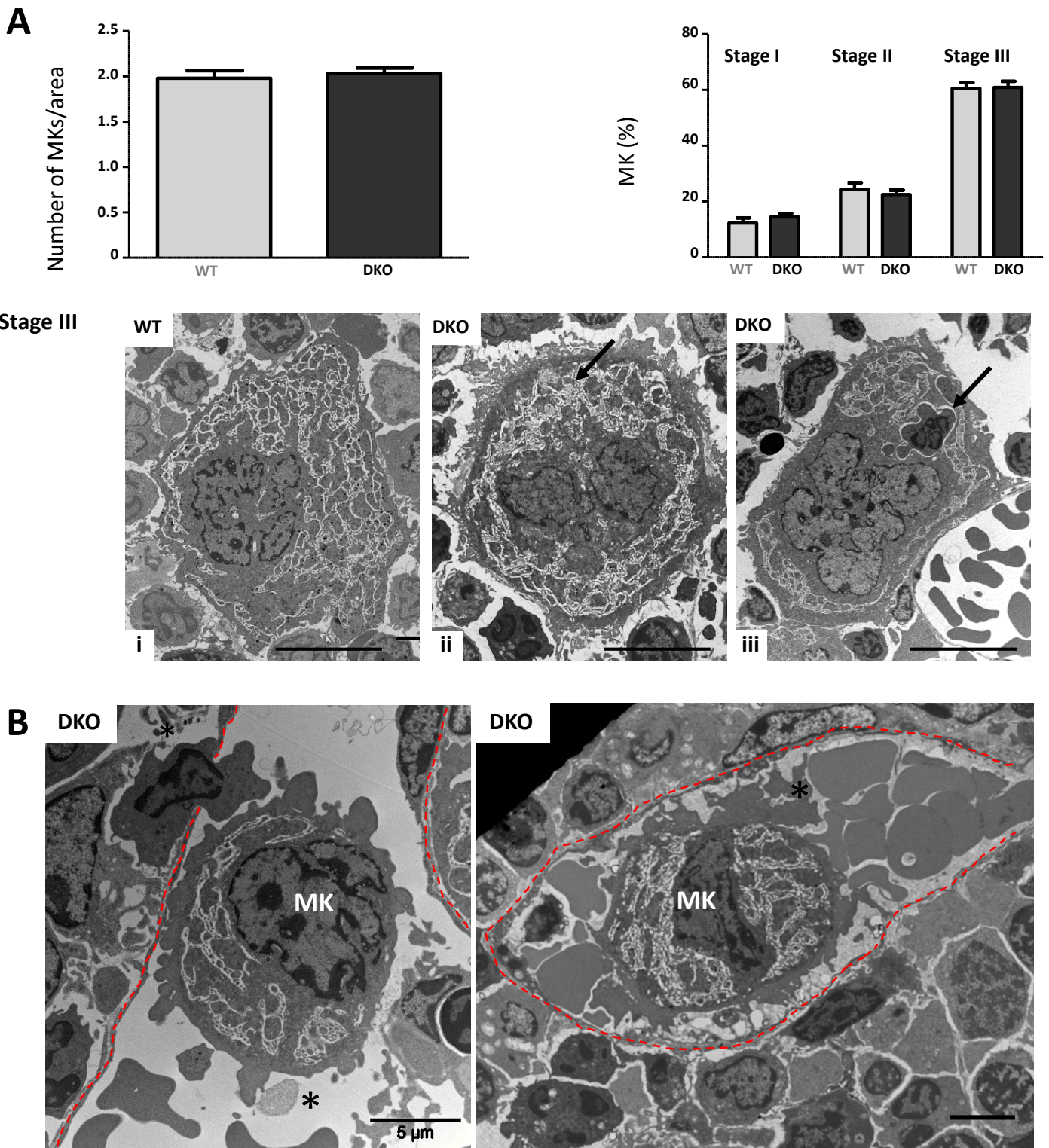


Figure 1

RESULTS

Combined deletion of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins causes the passage of intact MKs into the blood circulation

To study the role of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins in MK transmigration, mice with a conditional double deficiency (DKO) in the MK lineage were generated using the Pf4-Cre/lox strategy. We first investigate the impact of combined $\beta 1$ $\beta 3$ integrins deletion on megakaryopoiesis, by examining the MK ultrastructure *in situ* by transmission electron microscopy. In DKO mice, the number and the distribution of the different MK maturation stages were similar to WT mice (Figure 1A-B). However, while mature WT MKs showed a defined DMS with clearly delineated cytoplasmic territories, DKO MKs exhibited abnormal DMS organization associated with reduced cytoplasmic territories and had frequent emperipolesis (DKO $15.2 \pm 3\%$ vs WT $4.5 \pm 2.2\%$, $p < 0.01$) (Figure 1C). But the most striking observation was the presence of intact mature MKs located in the sinusoid lumen in DKO BM, an event that was not observed in WT BM. They were of similar size and ultrastructure to those in the stroma compartment, suggesting that altered size are not the triggering event for their transendothelial passage (Figure 1D). To estimate the degree of this defect, we examined the distribution of MKs by performing 3D immunofluorescence microscopy on thick BM sections. In these experiments, the transmigration abnormality of MKs in DKO mice was even more evident, as we see more MKs in transmigration and more whole MKs and fragments in the blood circulation. (Figure 2A). Quantitative analysis revealed a six-fold increase of these transmigrating events in DKO mice as compared to WT (DKO $23.6 \pm 3\%$ vs WT $3.8 \pm 1.4\%$ per visual field; $P < 0.01$) including $7.6 \pm 2\%$ of intact MKs in the circulation. We measured the diameter of the endothelial pores and found no difference between both genotypes (DKO: $4.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$, $n=33$ vs WT: $4.3 \pm 0.4 \mu\text{m}$, $n=12$ $P > 0.05$) indicating that the passage of intact DKO MKs do not result from an increased size of endothelial pores. To determine which of the two integrins was responsible for this MK phenotype, we used simple knock-out mice (Supplemental Figure S1). Intact MKs in the sinusoidal lumen were not found in single knock-out mice, but we observed an increase of intravascular fragments in *Itgb1*^{-/-} MKs suggesting a preferential contribution of $\beta 1$ integrin in the MK transendothelial passage. To evaluate the effect of the integrins ablation in a more dynamic setting, we directly visualized the MK behavior using intravital 2-photon microscopy imaging (Figure 2B). This confirmed the release of intact DKO MKs into the blood stream, validated the fact that these MKs are large mature cells, and also revealed the cellular

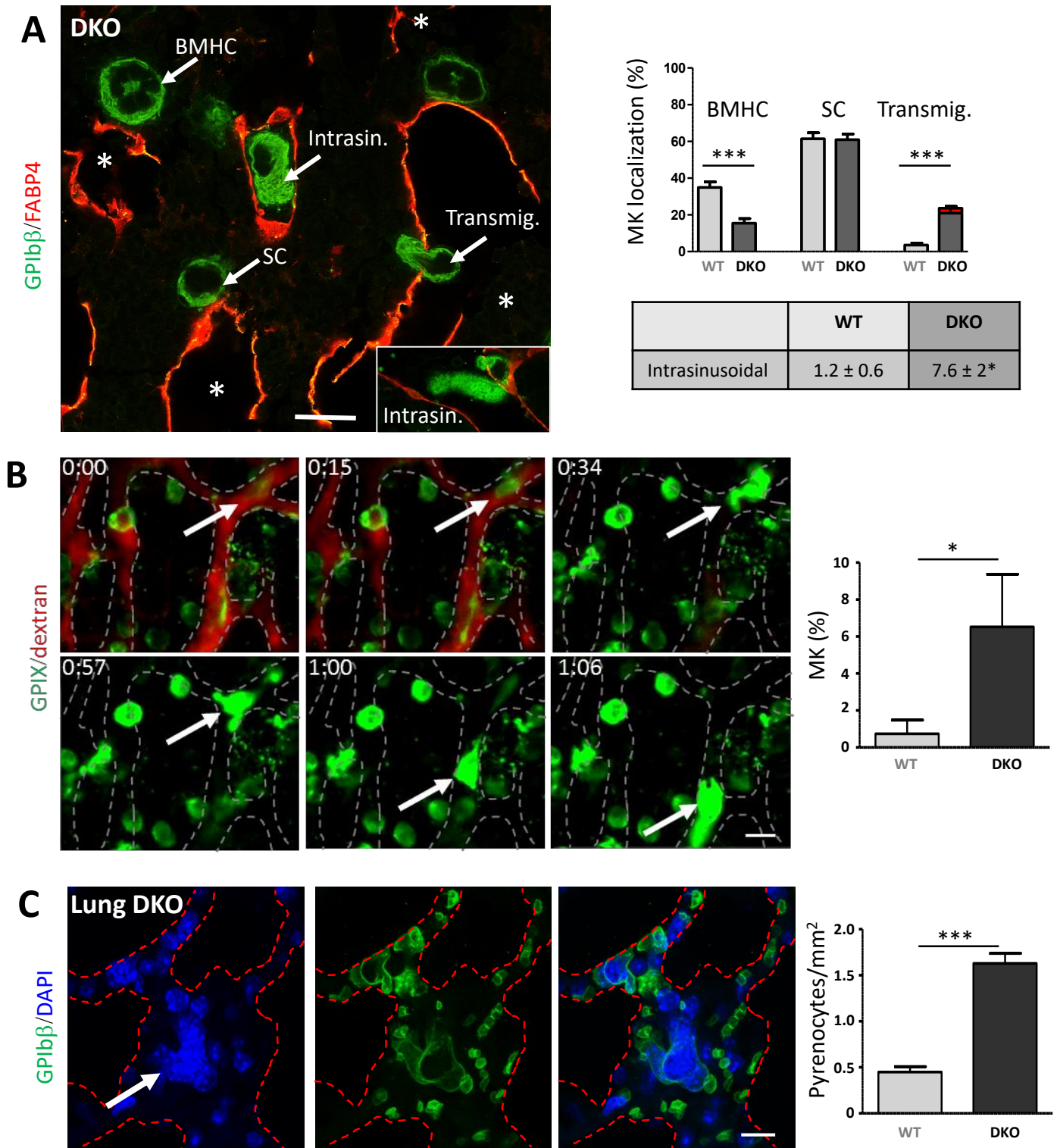


Figure 2

distortions allowing the DKO MKs to leave the marrow and slide intactly into the blood circulation ([Supplemental movie S1](#)). Accordingly, large MK nuclei were found in the downstream pulmonary capillaries of DKO mice, a finding not observed to that extent in WT mice ([Figure 2C](#)).

In summary, these findings demonstrated that integrins play a key role in controlling MK transmigration, acting as negative regulators to prevent the passage of intact MKs through the bone marrow sinusoids.

Integrins maintain MK anchoring to the surrounding bone marrow tissue

We hypothesized that defective anchoring of MKs in DKO mice may be a cause of their enhanced transmigration. We first examined surface expression of activated $\beta 1$ integrin *in situ* on BM cryosections of WT mice and found staining on the sinusoids and at the periphery of the MKs where it appears as fluorescent clusters ([Figure 3A](#)). Co-staining studies demonstrated that these $\beta 1$ integrin-positive clusters are associated with fibronectin, suggesting that MK bind to the bone marrow through fibronectin- $\beta 1$ integrin contact sites ([Figure 3B](#)). This stood in contrast to the transmigrating WT MKs devoid of such contact sites, likely reflecting that these cells lose their interactions with the ECM when they enter the circulation ([data not shown](#)). As expected, these contact sites were absent in DKO mice, suggesting that these MKs are less well anchored to their ECM microenvironment ([Figure 3C](#)). Besides being adhesive receptors, integrins are recognized for their role in ECM remodeling [37]–[39]. Thus, we determined the distribution of fibronectin and fibrinogen in the bone marrow of WT and DKO mice. Depletion of integrins causes a significant reduction in the expression of extracellular fibronectin around MKs, without affecting fibronectin deposits in the basement membrane around sinusoids ([Figure 3D](#)). We also investigated the impact of integrin depletion on fibrinogen distribution and found that its primarily localization in granules was lost, as previously reported ([Figure 3E](#)). Instead, DKO mice exhibited fibrinogen localization in the extracellular space of the DMS, as confirmed by immunogoldEM (IEM) ([Supplemental Figure S2](#)).

To next investigate whether integrin play a functional role in the MK anchorage to ECM and endothelial cells by analyzing their cell shape using scanning electron microscopy ([Figure 4A](#)). While almost all WT MKs flatten on fibronectin and fibrinogen reaching diameters over 100 μm , DKO MKs fail to spread and still exhibited a round shape. We quantified the number of

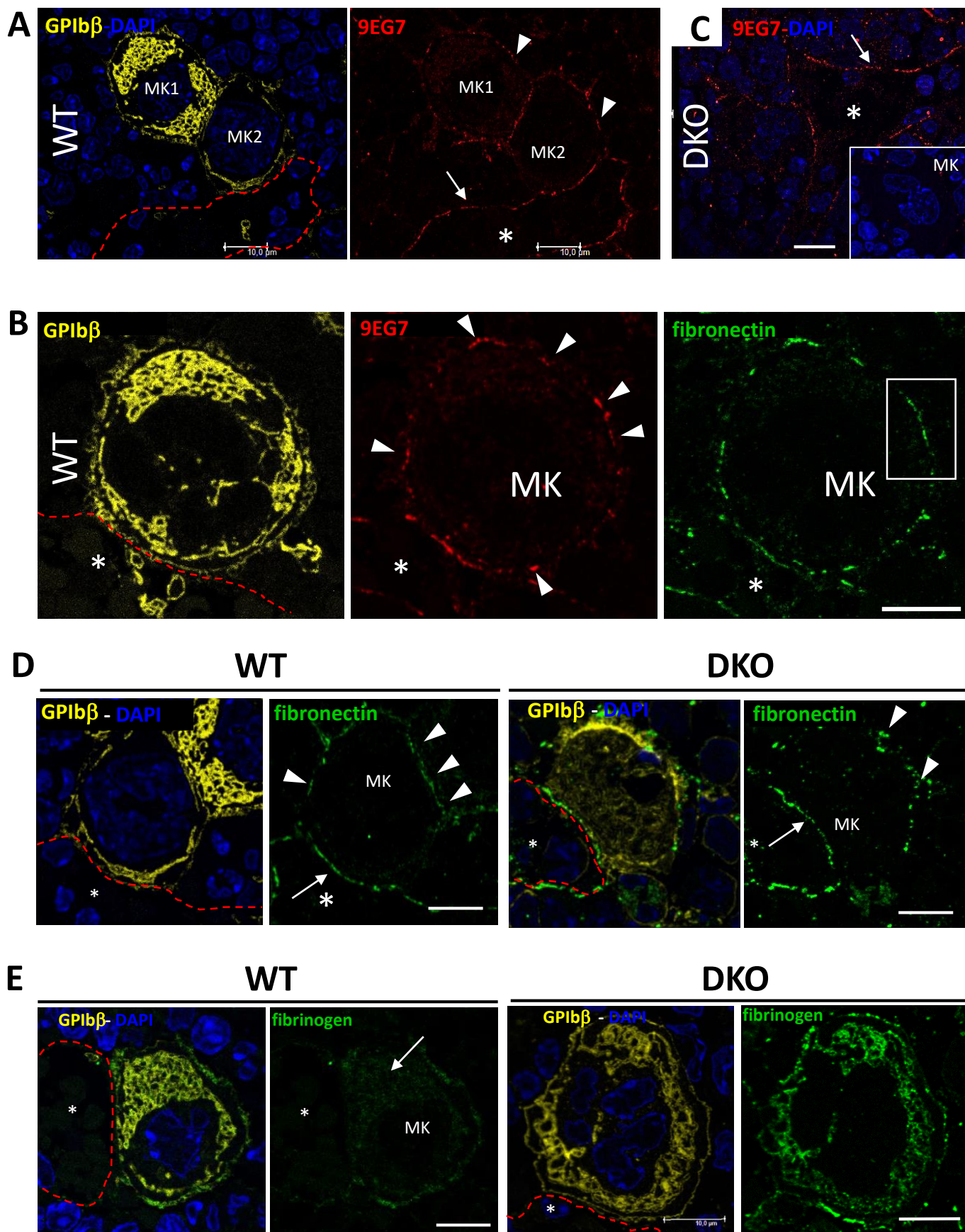


Figure 3

adhering cells, and it was significantly reduced for DKO MKs adhering on both fibronectin and fibrinogen. No difference in the number of adhering MKs and in their shape were observed between both genotypes when the assays were performed on endothelial cells instead of matrix proteins, suggesting minimal effect of the integrins regarding MK attachment to endothelial cells. To better recapitulate physiological conditions, we next probed the overall interactions of MKs with interstitial matrix in BM explants and with neighboring cells using freshly isolated BM explants. In this model, cells migrate out of the BM explants, forming a layer in which MKs become progressively visible and allowing to count the number of MKs released at the periphery of the explant [32] (Figure 4B). We observed a trend toward an increase in the number of MKs released from DKO BM explants as compared with WT BM explants, reaching a plateau at 6h. Together, these results emphasize the important contribution of integrins in the matrix organization around MKs, in addition to their role in modulating ECM-mediated adhesion processes in the bone marrow.

$\beta 1$ and $\beta 3$ integrins are dispensable in the podosome-mediated transendothelial penetration

To further dissect the mechanisms underlying the transmigration defect in DKO MKs, we assessed the formation of podosomes known to be important in MK-sinusoid interactions and ECM remodeling [14], [16]. By fluorescence microscopy, podosomes appeared classically as SiR-actin stained F-actin dots on the ventral surface of MKs and both integrins were found within the rings around the actin dots (Figure 5A). DKO MKs were able to develop podosomes on different substrates (fibrinogen, fibronectin and endothelial cells) similarly to WT MK, as evaluated by the quantification of the percentage of MKs displaying podosomes and the podosome density (Figure 5B). Given that ECM degradation is a hallmark of podosome function, we checked whether DKO MKs exhibit higher digestive ability of the matrix by analyzing gelatin-FITC green surface degradation. Notably, unlike previously described [16], ECM degradation was virtually absent in native WT MKs and the same results were obtained for DKO MKs (Figure 5C). Tumoral 4T1 cells, which triggers large digested areas, were used as a positive control.

While podosomes develop only on the ventral surface of MKs in a 2D context, we could recently show that *in situ* they appear interconnected on the periphery of MKs, a collective organization essential to drive transendothelial pores [14]. To investigate this spatial

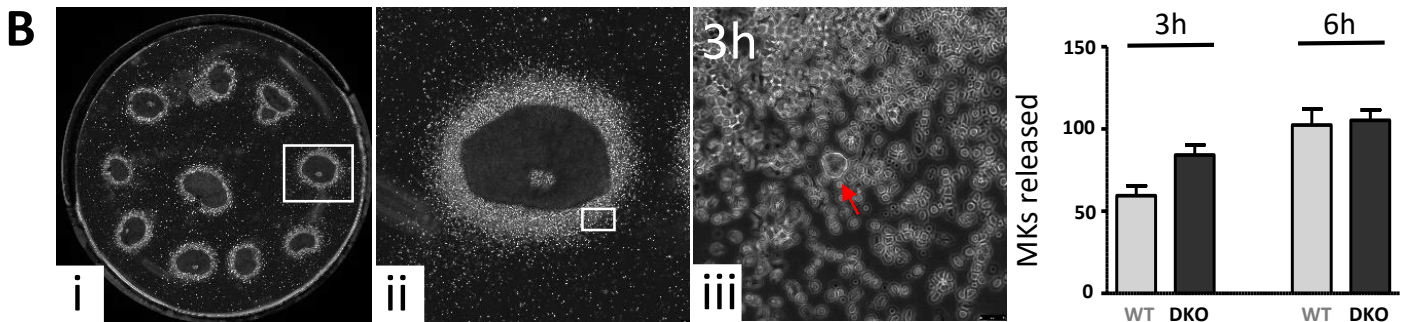
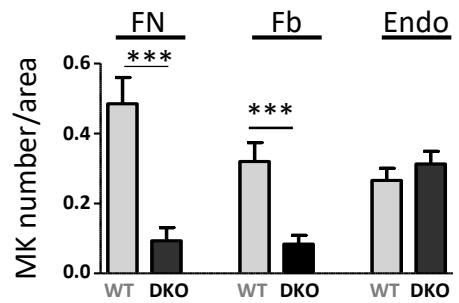
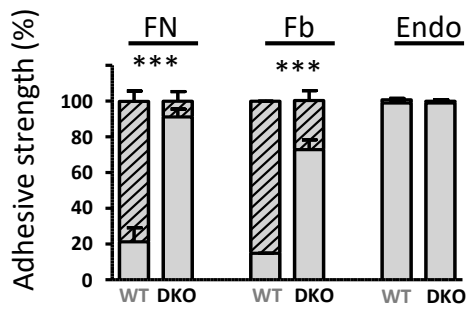
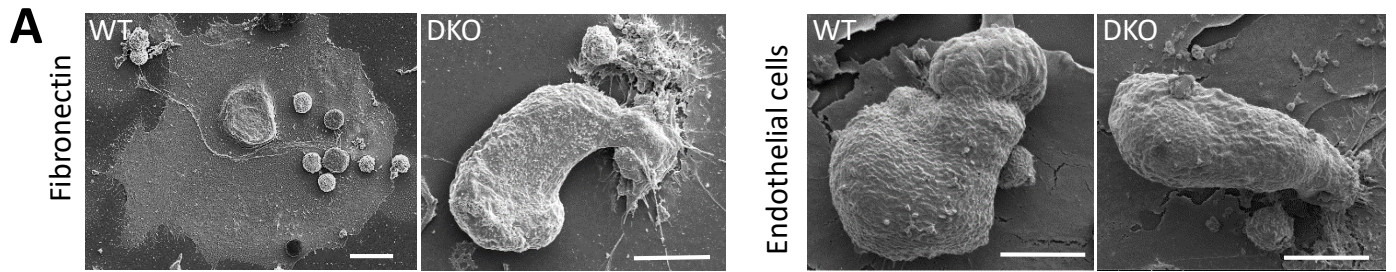


Figure 4

organization, we analyzed native flushed MKs, fixed upon their suspension to maintain their 3D organization, and found that DKO MKs exhibited a normal actomyosin peripheral cortex and a normal collective podosome distribution with comparable density to controls (Figure 5D). Given that the function of MK podosomes is to perforate the endothelial barrier, we examine the interactions between MKs and endothelial cells in BM thin sections of intact femora from DKO mice (Figure 5E). Transmission electron microscopy (TEM) images showed that DKO MKs were able to extend podosomes toward the endothelium. These protrusions were even able to push and invade the endothelium and form pores. Quantification of the different types of contacts indicated no significant difference in DKO versus WT mice. These results indicate that $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins do not play a significant role in podosome-mediated transendothelial passage of MKs.

Altered nucleus organization and abnormal lamin A/C expression in DKO megakaryocytes

The polylobulated nucleus, which is the largest and most rigid organelle in the cell, is a major physical constraint to MK transmigration [40]–[42]. We sought to determine why the nucleus of DKO MKs could cross through transendothelial pores that are smaller than their nuclear cross section. We first investigated whether endomitosis may be affected in DKO. We performed a ploidy analysis of native flushed BM MKs by flow cytometry and found that the ploidy distribution of DKO MKs was comparable to that of WT (Figure 6A). We next analyzed the architecture of the nucleus in MKs at different stages of transmigration by complete z-stack analysis of MKs stained with anti-GPIIb antibody and DAPI (Figure 6B). We found that the nucleus diameter of DKO MKs was significantly larger than that of WT MKs ($18 \pm 0.3 \mu\text{m}$ vs $15 \pm 0.26 \mu\text{m}$, $p < 0.01$). 3D renderings of the whole nucleus were generated to illustrate the full extent of the morphological abnormalities in DKO MKs (Supplemental Movies S2 and S3). This reveals the unfolded appearance of the DKO multilobulated nucleus, compared with the more compact conformation of the WT nucleus, leading to a significant increase in the ratio of the nucleus volume/entire MK volume in DKO MKs compared to WT MKs. These findings provide evidence that integrins control the MK nuclear size, volume and geometry.

It is known that the nuclear lamin A/C determines the stiffness of the nucleus [43]–[45], and that lower levels of lamin A/C facilitate cell migration through tight spaces [40], [42]. We therefore investigated the localization of lamin A/C in freshly BM-isolated MKs, using lamin

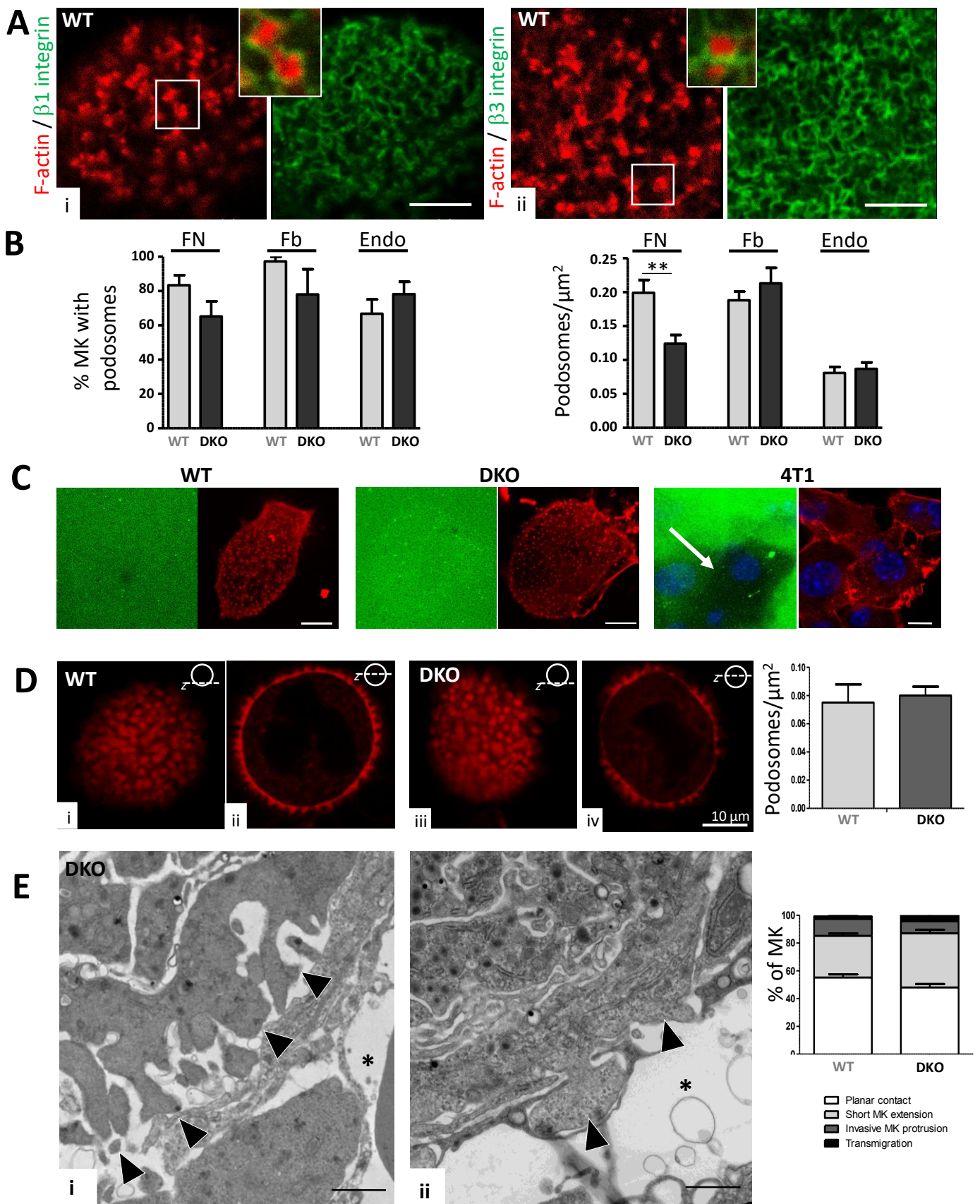
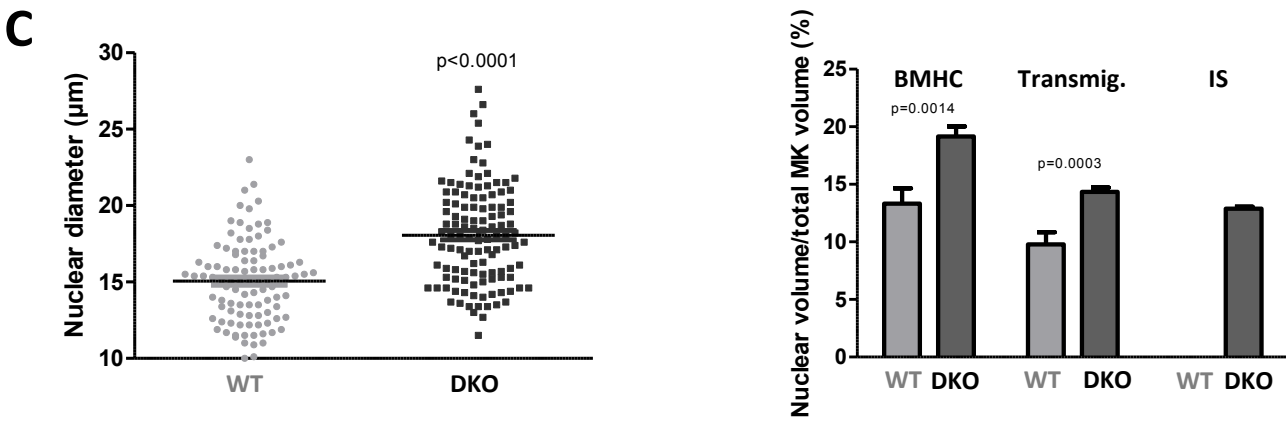
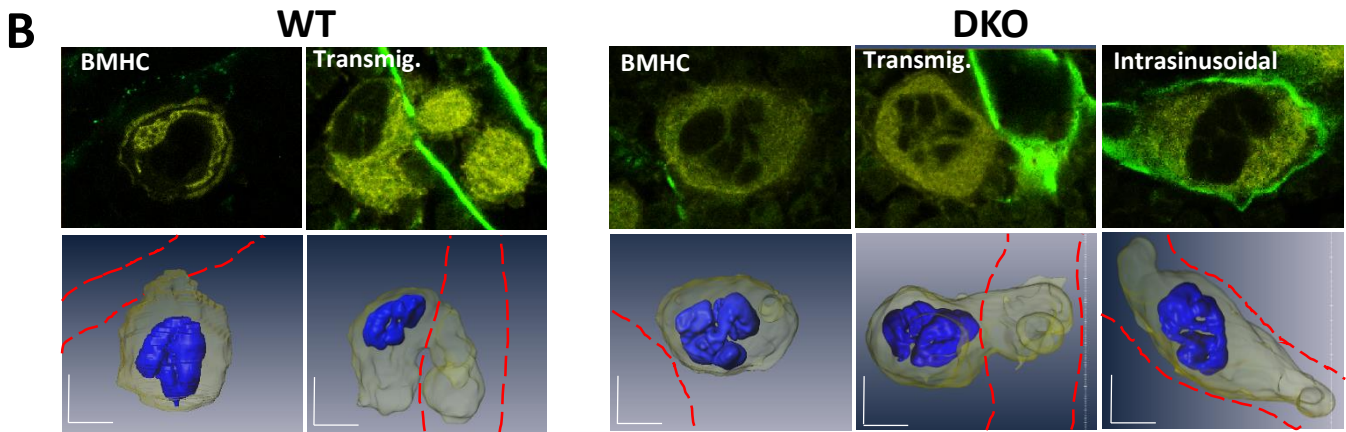
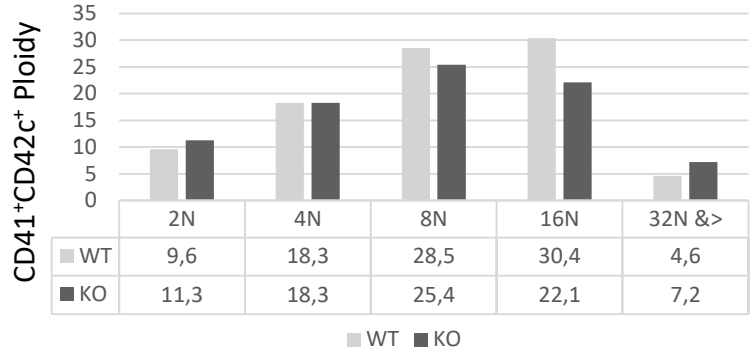
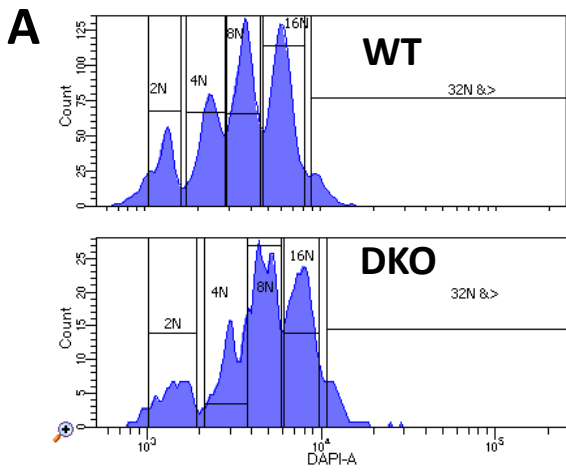


Figure 5

B1 as a reference for the nuclear stability [46] (Figure 7A). During maturation of WT MKs, we found an increase in lamin A/C expression along with a decrease in that of lamin B1. In mature stage III WT MKs, we observed a thin and continuous nuclear membrane staining for lamin A/C. In DKO MKs, the lamin A/C signal was more heterogeneous, with cells having either normal, discontinuous or no staining. We quantified these different populations according to their maturation stages and found that almost 80% of mature DKO MKs displayed an abnormal nuclear expression of lamin A/C (including no or discontinuous staining). Of note, we also observed a subpopulation of mature MKs which still retain their nuclear expression of lamin B1. Overall these data strongly suggest a link between the presence of integrins and MK nuclear properties.



Movies S2 and S3

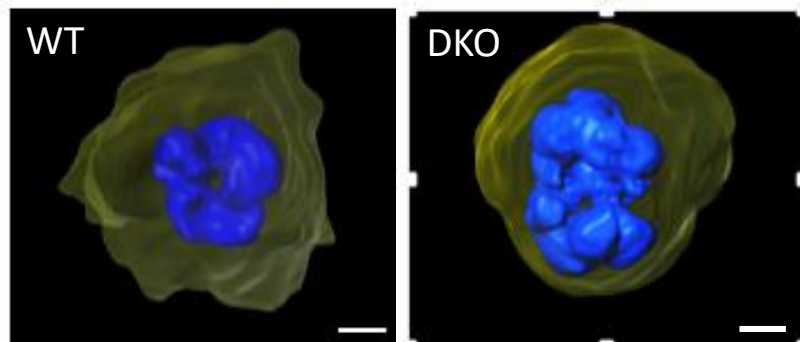


Figure 6

DISCUSSION

Platelet production depends on the transmigration of MKs when they leave the bone marrow and lose their interactions with the bone marrow microenvironment. The precise contribution of integrins in this process has never been studied. Here we used DKO mice lacking $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins in the platelet/MK lineage to demonstrate that these integrins tightly regulate MK transmigration by preventing the entry of entire MKs into the blood circulation. These studies highlight that both bone marrow anchoring and nuclear architecture regulated by integrins appear to be critical in MK transmigration, whereas a role of integrin in podosome generation appears to be less important. Furthermore, deletion of only one of the two integrins is not sufficient to induce the passage of whole MKs into the circulation, suggesting cooperativity between these two receptors.

In agreement with our EM observations in WT mice, initial direct visualization of bone marrow by two-photon electron microscopy rarely showed whole MKs extruded from the marrow, but rather the release of large cytoplasmic fragments [4]. In contrast, Lefrançois *et al.* documented pulmonary release of platelets from whole MKs that have physiologically traveled in the circulation from the bone marrow [10]. It is unclear why our results differ from these observations; but could be related to stress differences in the experimental conditions. However, both models are consistent with the much earlier observations of Howell *et al.* demonstrating that platelet numbers are higher in pulmonary veins than in arteries [47]. It is interesting to note that RhoA deletion also results in mislocalization of MKs, with 30% of intrasinusoidal MKs present in the vessel lumen. These authors propose a model in which platelet release is regulated by GTPases: RhoA emitting a "stop" signal and Cdc42 emitting a "go" signal, supporting the idea that GTPases act as molecular checkpoints [48]. Integrin engagement is known to stimulate RhoA GTPase activity promoting the generation of focal adhesions [49] and the induction of podosomes [50]–[52]. Thus, by controlling the interactions of MKs to their microenvironment, integrins may modulate the passage of MKs into the general circulation. This is in accordance with our observation that integrins-depleted MKs are unable to interact and spread on fibronectin/fibrinogen coated- surface [53], [54]. Also, based on our immunofluorescence data, and in accordance with previous observations, we observed that $\beta 1$ integrin interaction with ECM fibronectin may be important to promote MK localization at the sinusoids [31], [55].

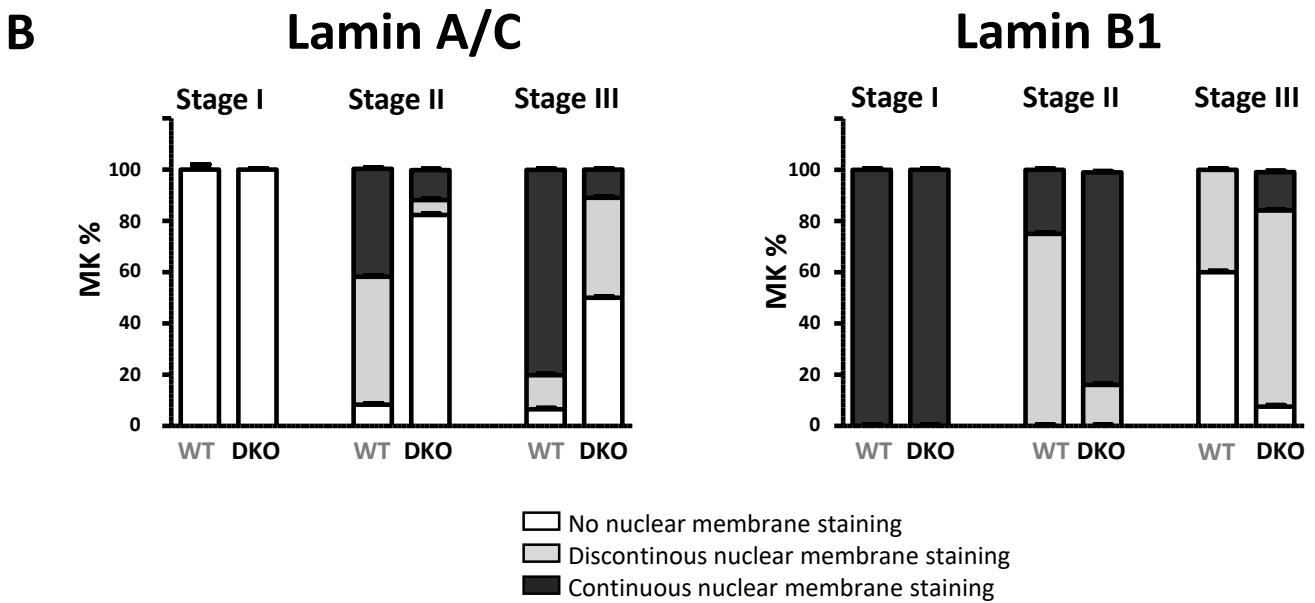
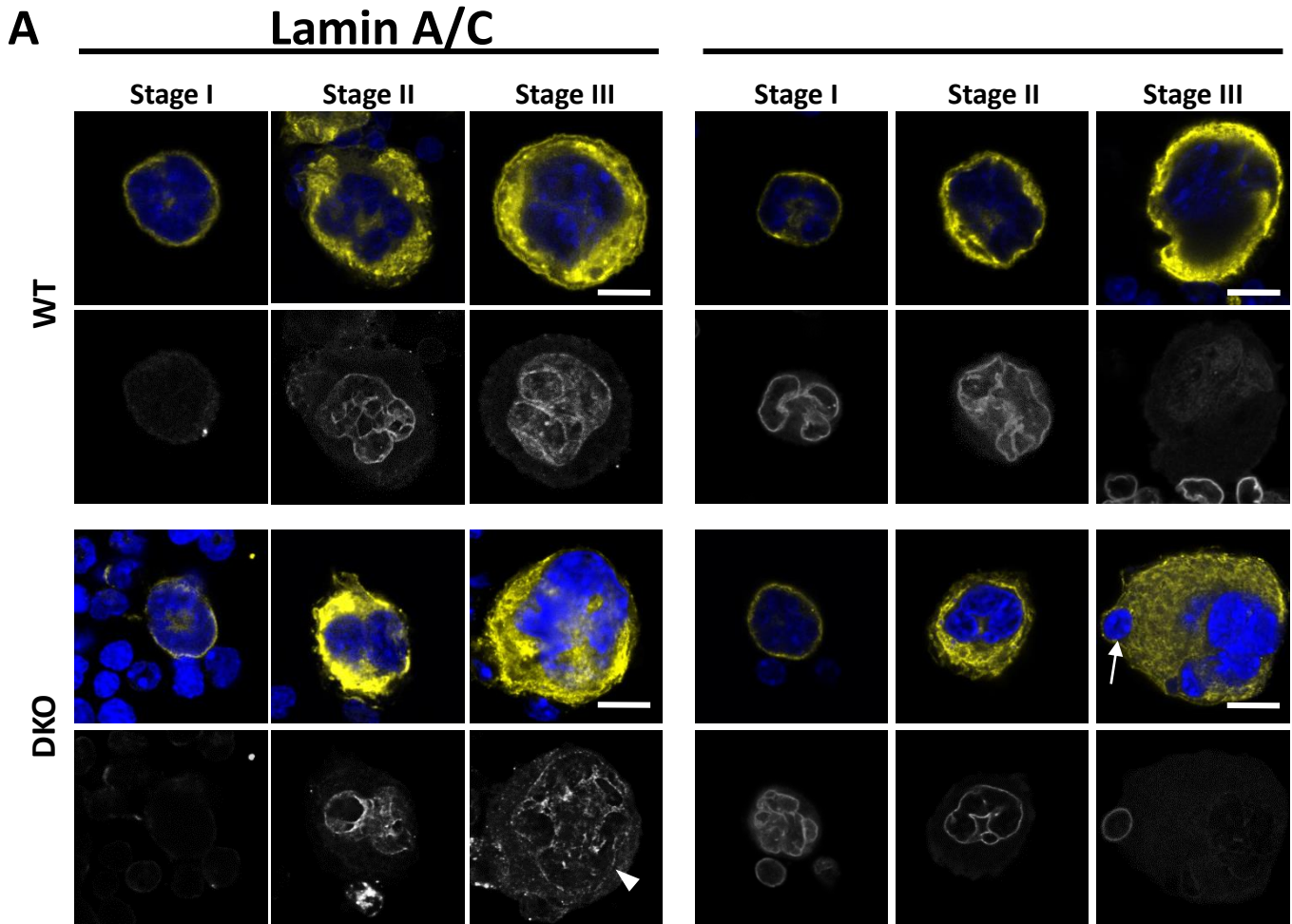
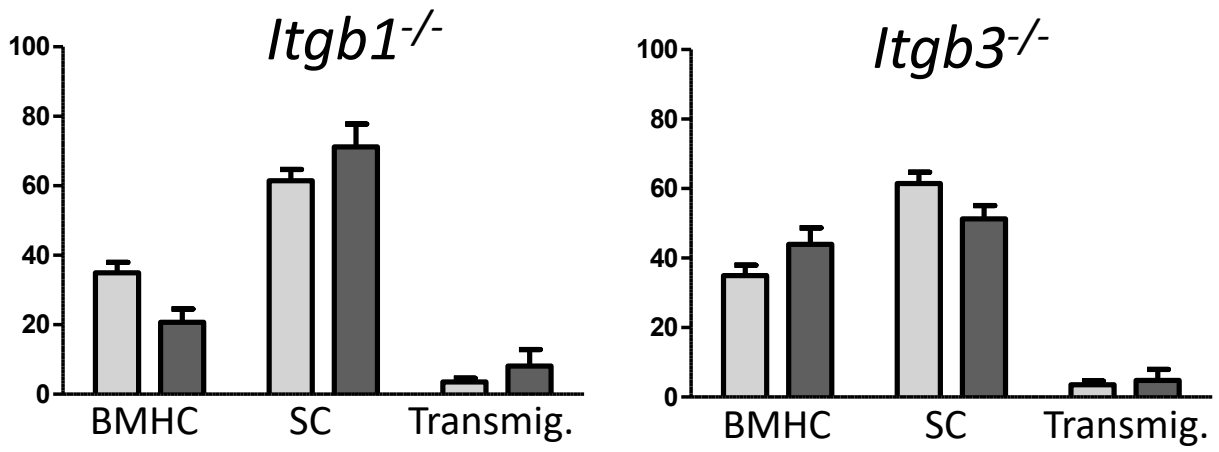


Figure 7

Integrins are implicated in the formation of podosomes and invadopodia in many cell types and we have recently demonstrated that *in vivo*, MKs used a transcellular mechanism that involved podosomes to cross the sinusoid endothelium. In the present study, we further studied the relationship between integrins and podosomes during MK transmigration. Although we found that $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins were present on MK podosomes, they do not appear to be required in the linkage of MK podosomes to the ECM. At this point, we cannot entirely exclude some activation of a compensatory network in genetic knockouts, as already reported for the F-actin binding proteins cortactin and HSP1 [56]. We searched for compensation by $\beta 2$ and $\beta 5$ integrins and were unable to detect any of these proteins on the platelet surface by flow cytometry. It is also possible that other adhesion receptors may contribute to MK podosome formation. As an example, CD44 is a cell surface receptor for hyaluronin acid, a major component of the basal lamina [57]. Studies on osteoclasts have indicated that CD44 could be directly associated with the actin core of podosomes and its activation was found sufficient to form a functional sealing zone, a large circular band of F-actin formed of podosomes [58]. It is not yet known whether similar processes are involved in MK podosome generation. However, CD44 was found expressed on mature MKs [59]–[61] and deregulation of hyaluronan expression at the bone marrow level could have a deleterious effect on thrombopoiesis, arguing for a role of the CD44 in MK transmigration [62].

A connection between integrins, cytoskeleton and nucleus was described more than 20 years ago [63]. We show herein that integrins regulated the size, shape and morphology of the MK nucleus, with a more compact conformation of the polylobulated nucleus in WT MK than in DKO MKs. The deformability of the nucleus is controlled by nuclear lamins A/C, which mechanically maintain the nuclear membrane and potentially impact the minimum tissue gaps that can be transmigrated [44], [45]. Although we do not yet know whether the nucleus of DKO MKs is more deformable than that of WT MKs, we found an abnormal nuclear distribution of lamin A/C in the absence of integrins $\beta 1$ and $\beta 3$. A better understanding of the physical properties of MK nuclei, i.e. their stiffness and deformability, and how integrins control the nuclear shape of transmigrating MKs would help to understand the reason why entire MKs do not transmigrate into the bloodstream in a physiological condition, which is an important factor in platelet biogenesis.

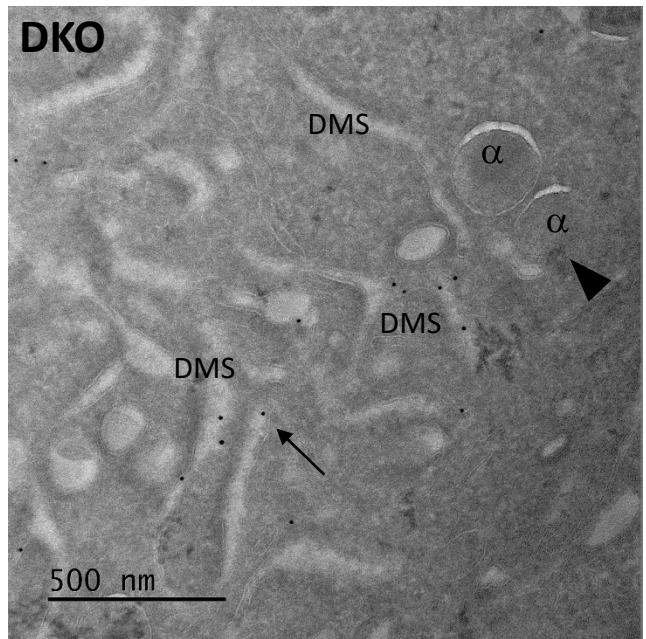
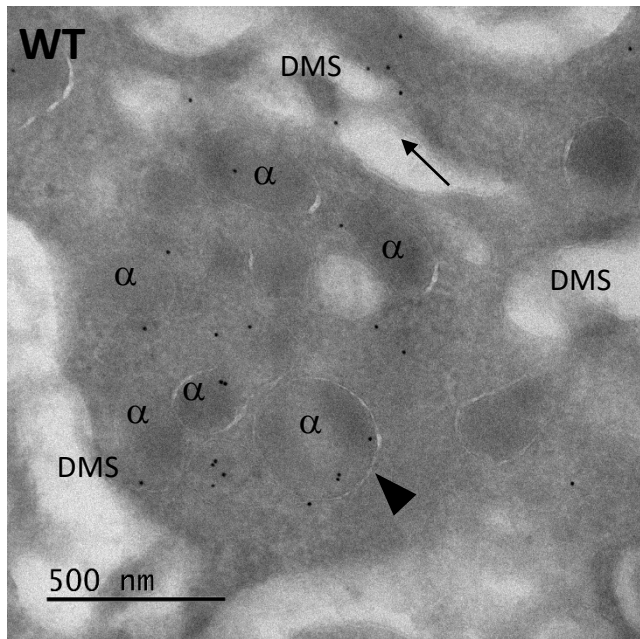


Supplemental Figure 1

Acknowledgments

This work was supported by ARMESA (Association de Recherche et Développement en Médecine et Santé Publique), the European Union through the European Regional Development Fund (ERDF) and by Grant ANR-17-CE14-0001-01 to H.d.S and Grant R01 HL133668 to W. B.

Fibrinogen¹⁰



Supplemental Figure 2

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Ultrastructural characterization of MKs from DKO mice (A) (Top left) Quantification of the BM MKs observed by electron microscopy, per surface unit (s.u., $12,945 \mu\text{m}^2$). (Top right) Classification of the MKs according to their maturation stage: stage I (presence of granules), stage II (developing DMS not yet organized), stage III (DMS organized in platelet territories). Data are reported as the percentage of the total number of MK. (Bottom) Representative TEM images of BM stage III MKs. (i) The DMS is well-defined with the presence of cytoplasmic territories in WT mice. (ii) In DKO mice, the DMS accumulates in packets without marking territories (arrow). (iii) Emperipolesis images on DKO bone marrow sections. The arrow points to a leucocyte within the MK cytoplasm. Scale bar, $10 \mu\text{m}$. Representative images were selected from 3 different mice per group. **(B)** Two representative TEM imaging illustrating the presence of intravascular entire *DKO* MKs containing a well-developed DMS (arrows). Scale bars, $5 \mu\text{m}$; *, vascular lumen. Red dotted lines indicate the sinusoid wall ($n=3$ WT and $n=3$ DKO). Bars represent mean \pm sem in 3 BM samples (total number of MK counted 199-205).

Figure 2: Passage of entire DKO MKs through the bone marrow sinusoids. (A) (Left) Representative confocal image of immunostained DKO MKs located in the hematopoietic BM compartment (BMHC), in contact with sinusoids (SC), in transmigration (Transmig.) or into the circulation (Intrasin.). MKs are shown by GPIIb β staining in green. FABP4 staining (red) labels the vessels. Asterisk indicates the sinusoid lumen. Scale bars, $10 \mu\text{m}$. (Right) Quantification of MKs localization in the BM reveals abundant transmigration events in DKO (black) MKs compared to the WT (grey) ($n=3$ for each genotype). The table shows a quantification of the percentage of intrasinusoidal MKs in Wt and DKO BM. **(B)** Intravital two-photon microscopy of DKO BM MKs. The arrow indicates the intrasinusoidal DKO MK, dotted lines illustrates the sinusoid wall and the values in the left corner the time-lapses. Quantification of intrasinusoidal entire MKs in WT (grey) and DKO (black) mice. **(C)** Representative confocal images of immunostained pyrenocytes located within the pulmonary microvessels of DKO mice. Pyrenocytes are shown by GPIIb β staining in green and MK nucleus are visualized by DAPI staining (arrow). Red dotted lines indicate the sinusoid wall. Scale bars, $10 \mu\text{m}$. Quantification of pyrenocytes in in WT (grey) and DKO (black) mice. Bar graphs represent mean \pm s.e.m. Two-

way ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons or T-test for simple comparison; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 3: Active $\beta 1$ integrins are present at MK surface and form contact zones with extracellular matrix. Immunofluorescence of WT and DKO mouse BM sections stained with the antibody 9EG7 directed against active $\beta 1$ integrin subunit (red), GPIIb β (yellow) and DAPI (blue). **(A)** Active $\beta 1$ integrins appear clustered at the plasma membrane of WT MK (arrowheads) and at the endothelium of sinusoids (arrows) and **(B)** correlate with fibronectin presence (white box). **(C)** Active $\beta 1$ is still expressed by endothelial cells but no staining is visible on DKO MKs (inset). **(E-F)** Immunofluorescence of WT and DKO mouse BM sections stained with the antibody directed against fibronectin (green) **(E)** and fibrinogen (green) **(F)**, GPIIb β (yellow) and DAPI (blue). Arrowheads point to the MK staining and arrows to the sinusoids. Asterisk indicates the sinusoid lumen. Red dotted lines indicate the sinusoid wall. Scale bars, 10 μm .

Figure 4. Altered DKO MKs adhesion, spreading and motility. (A) Impaired adhesion and spreading of DKO MKs to fibronectin and fibrinogen, but not to endothelial cells. Representative SEM images depicting BM-derived MKs adhering on fibronectin (left) and endothelial cells (right). Scale bars, 10 μm . Spreading (hatched bars) and round (grey bars) MKs were counted following 3h incubation on fibronectin- (FN), fibrinogen- (Fb) and endothelial cell-coated coverslips. Average of 100 MKs analyzed visual field per condition is shown. Values are mean \pm SEM of 3 independent experiments. Groups were compared using two-way ANOVA with Student *t*-test for multiple comparisons. **(B)** Representatives bright field images of the ten femur BM sections placed in an incubation chamber (left panel), of the box (center panel) and of the MKs released from the periphery of the explant (right panel). Quantification of the number of WT (grey) and DKO (black) MKs released from the explants following 3h and 6h (n=5 with 594-1158 MKs counted).

Figure 5. $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins do not affect podosome formation. (A) Murine MK podosomes express β integrins in their ring region. Representative images of the localization of $\beta 1$ or $\beta 3$ integrins in native MKs collected from *wt* BM. Cells were plated on coverslips coated with matrigel, fixed and stained for $\beta 1$ or $\beta 3$ integrins (green) and F-actin (red, SirAct). Images were acquired on the ventral surface of the cells with the boxed area enlarged in the middle column. Scale bars: 5 μm . **(B) Podosomes still form in the absence of $\beta 3$ and $\beta 1$ integrins.** Wt (gray bars) or DKO (dark bars) were plated for 3h and 6h onto coverslips coated with fibronectin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), fibrinogen (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or endothelial cells (confluent monolayer) and cells were examined for podosomes formation using systematic scanning of the coverslips. Quantification of the percentage of podosomes-containing MKs indicated a slight decrease when DKO cells adhere on $\beta 1$ and $\beta 3$ ligands. Individual podosomes were also counted and the results demonstrate that DKO MKs plated on fibronectin and fibrinogen have less podosomes as compared with *wt* MKs (36 cells scored per sample, error bars are the SEM. for triplicate biological samples, * $P >$, ** , unpaired t-test). **(C) BM native MKs do not digest gelatin matrix.** Native WT MKs(left), DKO MKs or 4T1 cancer cells were deposited on a fluorescent gelatin matrix (green) for 3h, labeled with the anti-actin probe Sir-Actin (red) and observed under a confocal microscope. Podosomes (in red, right pictures) at the contact interface with fibronectin (in green, left pictures). The dark area corresponds to fibronectin degradation under 4T1 cells. **(D) Loss of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins does not affect the 3D podosomes organization.** Representative confocal images showing the 3D podosomes organization in MK fixed after BM collection and labeled for F-actin (red). Images at two different z-values, bottom and middle, are shown. Scale bars: 10 μm . **(E)** Representative TEM images of the contact interface between MK and EC in DKO BM. Left, overview of a fully mature MK attached to the sinusoid; right: detail of the boxed area showing numerous MK extensions. Bar graph representing quantification of the different types of MK/EC contact in all *wt* and DKO MK. Error bars indicate the mean \pm SEM for 3 individual mice.

Figure 6. Lack of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins results in a loss of nuclear compactness. (A) Representative ploidy histogram of WT (grey trace) and DKO (dark trace) is shown. Flow cytometry analysis of BM MK ploidy in control (grey) and DKO (dark) mice. N=3 mice. **(B)** (Top) Confocal images showing the MKs (GPIIb β , in yellow) and the sinusoids (FABP4, in green) and

(Bottom) 3D reconstructions of the same MK. The red dotted lines indicate the sinusoids. Analysis of the nuclear diameters (N=100-117 MKs). **(C)** Analysis of the nuclear volume ratio on the total MK volume. At least 6 MKs were analyzed par animal (N=18-28 MKs). Values are means +/- s.e.m.

Figure 7. Nuclear membrane localization of lamins A/C and lamin B1 in WT and DKO native MKs **(A)** Representative confocal immunofluorescence images of DKO and WT MKs. Yellow: lamin B1 or A/C, Blue: DAPI. In WT MKs, the lamins A/C and B appear homogeneously distributed around MKs nucleus. In DKO MKs, the lamins A/C and B are miss localized around the MK nucleus. **(B)** Bar graph representing quantification of the different population of MKs having no nuclear membrane staining (white bar), discontinuous nuclear staining (grey bar) or continuous nuclear membrane staining of MK/EC contact in all *wt* and DKO MK. Representative of two experiments performed each on 3 mice.

Supplemental Figure 1. $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins are complementary to regulate MKs transmigration. Quantification of MKs localization in the BM of Simple Knock Out mice for $\beta 1$ (*itgb1^{-/-}*) and $\beta 3$ (*itgb3^{-/-}*) integrins. MKs located in the hematopoietic BM compartment (BMHC), in contact with sinusoids (SC), in transmigration (Transmig.) or into the circulation (Intrasin.). Quantification showed no significant increase in transmigration event in SKO mice as compared to the control, showing that both integrins regulate MK transmigration.

Supplemental Figure S2. ImmunogoldEM images showing fibrinogen staining with 10 nm gold particles located in the alpha granules of WT MKs and on the extracellular DMS side of DKO MKs.

REFERENCES

- [1] T. Guo, X. Wang, Y. Qu, Y. Yin, T. Jing, and Q. Zhang, "Megakaryopoiesis and platelet production: insight into hematopoietic stem cell proliferation and differentiation," *Stem Cell Investig*, vol. 2, p. 3, 2015, doi: 10.3978/j.issn.2306-9759.2015.02.01.
- [2] V. V. Shumyantseva *et al.*, "A new format of electrodes for the electrochemical reduction of cytochromes P450," *J Inorg Biochem*, vol. 100, no. 8, pp. 1353–1357, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2006.03.007.
- [3] A. Eckly *et al.*, "Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes," *Blood*, vol. 123, no. 6, pp. 921–930, Feb. 2014, doi: 10.1182/blood-2013-03-492330.
- [4] T. Junt *et al.*, "Dynamic Visualization of Thrombopoiesis Within Bone Marrow," *Science*, vol. 317, no. 5845, pp. 1767–1770, Sep. 2007, doi: 10.1126/science.1146304.
- [5] S. Sun, J. M. Zimmet, P. Toselli, A. Thompson, C. W. Jackson, and K. Ravid, "Overexpression of cyclin D1 moderately increases ploidy in megakaryocytes," *Haematologica*, vol. 86, no. 1, pp. 17–23, Jan. 2001.
- [6] O. Behnke and A. Forer, "From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream," *European Journal of Haematology*, vol. 60, no. S61, pp. 3–23, Dec. 1998, doi: 10.1111/j.1600-0609.1998.tb01052.x.
- [7] K. S. Potts *et al.*, "Membrane budding is a major mechanism of in vivo platelet biogenesis," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 217, no. 9, p. e20191206, Sep. 2020, doi: 10.1084/jem.20191206.
- [8] J. M. Radley and C. J. Haller, "Fate of senescent megakaryocytes in the bone marrow," *Br. J. Haematol.*, vol. 53, no. 2, pp. 277–287, Feb. 1983.
- [9] M. Tavassoli and M. Aoki, "Migration of Entire Megakaryocytes through the Marrow-Blood Barrier," *British Journal of Haematology*, vol. 48, no. 1, pp. 25–29, 1981, doi: 10.1111/j.1365-2141.1981.00025.x.
- [10] E. Lefrançois *et al.*, "The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors," *Nature*, vol. 544, no. 7648, pp. 105–109, Apr. 2017, doi: 10.1038/nature21706.
- [11] L. Aschoff, "Ueber capilläre Embolie von riesenkernhaltigen Zellen," *Archiv f. pathol. Anat.*, vol. 134, no. 1, pp. 11–25, Oct. 1893, doi: 10.1007/BF01924893.
- [12] M. Muto, "A scanning and transmission electron microscopic study on rat bone marrow sinuses and transmural migration of blood cells," *Arch Histol Jpn*, vol. 39, no. 1, pp. 51–66, Mar. 1976.
- [13] P. P. H. De Bruyn, S. Michelson, and T. B. Thomas, "The migration of blood cells of the bone marrow through the sinusoidal wall," *Journal of Morphology*, vol. 133, no. 4, pp. 417–437, Apr. 1971, doi: 10.1002/jmor.1051330406.
- [14] A. Eckly *et al.*, "Megakaryocytes use in vivo podosome-like structures working collectively to penetrate the endothelial barrier of bone marrow sinusoids," *J Thromb Haemost*, p. jth.15024, Aug. 2020, doi: 10.1111/jth.15024.
- [15] S. Linder, "The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation," *Trends in Cell Biology*, vol. 17, no. 3, pp. 107–117, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.tcb.2007.01.002.
- [16] H. Schachtner *et al.*, "Megakaryocytes assemble podosomes that degrade matrix and protrude through basement membrane," *Blood*, vol. 121, no. 13, pp. 2542–2552, Mar. 2013, doi: 10.1182/blood-2012-07-443457.
- [17] S. Sabri *et al.*, "Deficiency in the Wiskott-Aldrich protein induces premature proplatelet formation and platelet production in the bone marrow compartment," *Blood*, vol. 108, no. 1, pp. 134–140, Jul. 2006, doi: 10.1182/blood-2005-03-1219.
- [18] D. S. Paul *et al.*, "Deletion of the Arp2/3 complex in megakaryocytes leads to microthrombocytopenia in mice," *Blood Adv*, vol. 1, no. 18, pp. 1398–1408, Aug. 2017, doi: 10.1182/bloodadvances.2017006973.

- [19] M. Spindler *et al.*, “ADAP deficiency impairs megakaryocyte polarization with ectopic proplatelet release and causes microthrombocytopenia,” *Blood*, vol. 132, no. 6, pp. 635–646, Aug. 2018, doi: 10.1182/blood-2018-01-829259.
- [20] S. Bhatlekar *et al.*, “miR-125a-5p regulates megakaryocyte proplatelet formation via the actin-bundling protein L-plastin,” *Blood*, vol. 136, no. 15, pp. 1760–1772, Oct. 2020, doi: 10.1182/blood.2020005230.
- [21] S. Geue *et al.*, “Pivotal role of PDK1 in megakaryocyte cytoskeletal dynamics and polarization during platelet biogenesis,” *Blood*, vol. 134, no. 21, pp. 1847–1858, Nov. 2019, doi: 10.1182/blood.2019000185.
- [22] T. Heib *et al.*, “RhoA/Cdc42 signaling drives cytoplasmic maturation but not endomitosis in megakaryocytes,” *Cell Reports*, vol. 35, no. 6, p. 109102, May 2021, doi: 10.1016/j.celrep.2021.109102.
- [23] P. Mossuz, A. Schweitzer, A. Molla, and R. Berthier, “Expression and function of receptors for extracellular matrix molecules in the differentiation of human megakaryocytes *in vitro*,” *British Journal of Haematology*, vol. 98, no. 4, pp. 819–827, Sep. 1997, doi: 10.1046/j.1365-2141.1997.3013118.x.
- [24] Y. A. Senis *et al.*, “A Comprehensive Proteomics and Genomics Analysis Reveals Novel Transmembrane Proteins in Human Platelets and Mouse Megakaryocytes Including G6b-B, a Novel Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif Protein,” *Mol Cell Proteomics*, vol. 6, no. 3, pp. 548–564, Mar. 2007, doi: 10.1074/mcp.D600007-MCP200.
- [25] A. T. Nurden, “Glanzmann thrombasthenia,” *Orphanet J Rare Dis*, vol. 1, no. 1, p. 10, Dec. 2006, doi: 10.1186/1750-1172-1-10.
- [26] D. Habart, Y. Cheli, D. J. Nugent, Z. M. Ruggeri, and T. J. Kunicki, “Conditional Knockout of Integrin $\alpha 2\beta 1$ in Murine Megakaryocytes Leads to Reduced Mean Platelet Volume,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 1, p. e55094, Jan. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0055094.
- [27] E. A. Morgan *et al.*, “Dissection of platelet and myeloid cell defects by conditional targeting of the $\beta 3$ -integrin subunit,” *The FASEB Journal*, vol. 24, no. 4, pp. 1117–1127, Apr. 2010, doi: 10.1096/fj.09-138420.
- [28] M. Schaff *et al.*, “Integrin $\alpha 6\beta 1$ Is the Main Receptor for Vascular Laminins and Plays a Role in Platelet Adhesion, Activation, and Arterial Thrombosis,” *Circulation*, vol. 128, no. 5, pp. 541–552, Jul. 2013, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000799.
- [29] L. Bury, E. Falcinelli, D. Chiasserini, T. A. Springer, J. E. Italiano, and P. Gresele, “Cytoskeletal perturbation leads to platelet dysfunction and thrombocytopenia in variant forms of Glanzmann thrombasthenia,” *Haematologica*, vol. 101, no. 1, pp. 46–56, Jan. 2016, doi: 10.3324/haematol.2015.130849.
- [30] H. Kashiwagi *et al.*, “Demonstration of novel gain-of-function mutations of $\alpha 11\beta 3$: association with macrothrombocytopenia and glanzmann thrombasthenia-like phenotype,” *Mol Genet Genomic Med*, vol. 1, no. 2, pp. 77–86, Jul. 2013, doi: 10.1002/mgg3.9.
- [31] S. Giannini *et al.*, “ $\beta 4\text{GALT}1$ controls $\beta 1$ integrin function to govern thrombopoiesis and hematopoietic stem cell homeostasis,” *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, p. 356, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-019-14178-y.
- [32] S. Matsuura *et al.*, “Adhesion to fibronectin via $\alpha 5\beta 1$ integrin supports expansion of the megakaryocyte lineage in primary myelofibrosis,” *Blood*, vol. 135, no. 25, pp. 2286–2291, Jun. 2020, doi: 10.1182/blood.2019004230.
- [33] C. Perrault *et al.*, “A novel monoclonal antibody against the extracellular domain of GPIIb β modulates vWF mediated platelet adhesion,” *Thromb Haemost*, vol. 86, no. 5, pp. 1238–1248, Nov. 2001.
- [34] D. L. Coutu, K. D. Kokkaliaris, L. Kunz, and T. Schroeder, “Three-dimensional map of nonhematopoietic bone and bone-marrow cells and molecules,” *Nat Biotechnol*, vol. 35, no. 12, pp. 1202–1210, Dec. 2017, doi: 10.1038/nbt.4006.
- [35] A. Eckly, C. Strassel, J.-P. Cazenave, F. Lanza, C. Léon, and C. Gachet, “Characterization of Megakaryocyte Development in the Native Bone Marrow Environment,” in *Platelets and*

- Megakaryocytes*, vol. 788, J. M. Gibbins and M. P. Mahaut-Smith, Eds. New York, NY: Springer New York, 2012, pp. 175–192. doi: 10.1007/978-1-61779-307-3_13.
- [36] I. Guinard, F. Lanza, C. Gachet, C. Léon, and A. Eckly, “Proplatelet Formation Dynamics of Mouse Fresh Bone Marrow Explants,” *JoVE*, no. 171, p. 62501, May 2021, doi: 10.3791/62501.
- [37] H. C. Hsia, M. R. Nair, and S. A. Corbett, “The fate of internalized $\alpha 5$ integrin is regulated by matrix-capable fibronectin,” *Journal of Surgical Research*, vol. 191, no. 2, pp. 268–279, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.jss.2014.05.084.
- [38] K. Clark *et al.*, “A specific alpha5beta1-integrin conformation promotes directional integrin translocation and fibronectin matrix formation,” *J Cell Sci*, vol. 118, no. Pt 2, pp. 291–300, Jan. 2005, doi: 10.1242/jcs.01623.
- [39] E. H. J. Danen, P. Sonneveld, C. Brakebusch, R. Fässler, and A. Sonnenberg, “The fibronectin-binding integrins $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha \nu \beta 3$ differentially modulate RhoA–GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis,” *Journal of Cell Biology*, vol. 159, no. 6, pp. 1071–1086, Dec. 2002, doi: 10.1083/jcb.200205014.
- [40] P. M. Davidson, J. Sliz, P. Isermann, C. Denais, and J. Lammerding, “Design of a microfluidic device to quantify dynamic intra-nuclear deformation during cell migration through confining environments,” *Integr. Biol.*, vol. 7, no. 12, pp. 1534–1546, 2015, doi: 10.1039/C5IB00200A.
- [41] K. Wolf *et al.*, “Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force,” *J Cell Biol*, vol. 201, no. 7, pp. 1069–1084, Jun. 2013, doi: 10.1083/jcb.201210152.
- [42] T. Harada *et al.*, “Nuclear lamin stiffness is a barrier to 3D migration, but softness can limit survival,” *J Cell Biol*, vol. 204, no. 5, pp. 669–682, Mar. 2014, doi: 10.1083/jcb.201308029.
- [43] J. Swift *et al.*, “Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation,” *Science*, vol. 341, no. 6149, p. 1240104, Aug. 2013, doi: 10.1126/science.1240104.
- [44] J. Lammerding *et al.*, “Lamins A and C but Not Lamin B1 Regulate Nuclear Mechanics,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 35, pp. 25768–25780, Sep. 2006, doi: 10.1074/jbc.M513511200.
- [45] K. N. Dahl, A. J. S. Ribeiro, and J. Lammerding, “Nuclear Shape, Mechanics, and Mechanotransduction,” *Circulation Research*, vol. 102, no. 11, pp. 1307–1318, Jun. 2008, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.173989.
- [46] M. W. Goldberg, I. Huttenlauch, C. J. Hutchison, and R. Stick, “Filaments made from A- and B-type lamins differ in structure and organization,” *Journal of Cell Science*, vol. 121, no. 2, pp. 215–225, Jan. 2008, doi: 10.1242/jcs.022020.
- [47] W. H. Howell and D. D. Donahue, “The production of blood platelets in the lungs,” *J Exp Med*, vol. 65, no. 2, pp. 177–203, Jan. 1937, doi: 10.1084/jem.65.2.177.
- [48] S. Dütting *et al.*, “A Cdc42/RhoA regulatory circuit downstream of glycoprotein Ib guides transendothelial platelet biogenesis,” *Nature Communications*, vol. 8, p. 15838, Jun. 2017, doi: 10.1038/ncomms15838.
- [49] A. D. Dubash *et al.*, “Chapter 1 Focal Adhesions: New Angles on an Old Structure,” in *International Review of Cell and Molecular Biology*, vol. 277, Elsevier, 2009, pp. 1–65. doi: 10.1016/S1937-6448(09)77001-7.
- [50] S. Zhang *et al.*, “Rho Family GTPases Regulate p38 Mitogen-activated Protein Kinase through the Downstream Mediator Pak1,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 41, pp. 23934–23936, Oct. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.41.23934.
- [51] O. Destaing *et al.*, “A novel Rho-mDia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclasts,” *J Cell Sci*, vol. 118, no. Pt 13, pp. 2901–2911, Jul. 2005, doi: 10.1242/jcs.02425.
- [52] M. A. Chellaiah *et al.*, “Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility, and bone resorption,” *J Biol Chem*, vol. 275, no. 16, pp. 11993–12002, Apr. 2000, doi: 10.1074/jbc.275.16.11993.

- [53] M. K. Larson and S. P. Watson, "Regulation of proplatelet formation and platelet release by integrin IIb β 3," *Blood*, vol. 108, no. 5, pp. 1509–1514, May 2006, doi: 10.1182/blood-2005-11-011957.
- [54] A. Balduini *et al.*, "Adhesive receptors, extracellular proteins and myosin IIA orchestrate proplatelet formation by human megakaryocytes," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 6, no. 11, pp. 1900–1907, Nov. 2008, doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03132.x.
- [55] S. T. Avezilla *et al.*, "Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis," *Nature Medicine*, vol. 10, no. 1, pp. 64–71, Jan. 2004, doi: 10.1038/nm973.
- [56] S. G. Thomas, N. S. Poulter, D. Bem, B. Finney, L. M. Machesky, and S. P. Watson, "The actin binding proteins cortactin and HS1 are dispensable for platelet actin nodule and megakaryocyte podosome formation," *Platelets*, vol. 28, no. 4, pp. 372–379, May 2017, doi: 10.1080/09537104.2016.1235688.
- [57] H. Ponta, L. Sherman, and P. A. Herrlich, "CD44: from adhesion molecules to signalling regulators," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 4, no. 1, pp. 33–45, Jan. 2003, doi: 10.1038/nrm1004.
- [58] F. Saltel, A. Chabadel, E. Bonnelye, and P. Jurdic, "Actin cytoskeletal organisation in osteoclasts: A model to decipher transmigration and matrix degradation," *European Journal of Cell Biology*, vol. 87, no. 8–9, pp. 459–468, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.ejcb.2008.01.001.
- [59] I. Koshiishi, M. Shizari, and C. B. Underhill, "CD44 can mediate the adhesion of platelets to hyaluronan," *Blood*, vol. 84, no. 2, pp. 390–396, Jul. 1994.
- [60] T. Hagiwara, T. Nagasawa, H. Nagahisa, M. Takizawa, M. Osada, and T. Abe, "Expression of adhesion molecules on cytoplasmic processes of human megakaryocytes," *Exp Hematol*, vol. 24, no. 6, pp. 690–695, May 1996.
- [61] M. Currao, A. Malara, C. A. Di Buduo, V. Abbonante, L. Tozzi, and A. Balduini, "Hyaluronan based hydrogels provide an improved model to study megakaryocyte–matrix interactions," *Experimental Cell Research*, vol. 346, no. 1, pp. 1–8, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.yexcr.2015.05.014.
- [62] A. C. Petrey, D. R. Obery, S. P. Kessler, B. Flamion, and C. A. de la Motte, "Hyaluronan Depolymerization by Megakaryocyte Hyaluronidase-2 Is Required for Thrombopoiesis," *The American Journal of Pathology*, vol. 186, no. 9, pp. 2390–2403, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.ajpath.2016.05.004.
- [63] A. J. Maniotis, C. S. Chen, and D. E. Ingber, "Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, no. 3, pp. 849–854, Feb. 1997, doi: 10.1073/pnas.94.3.849.

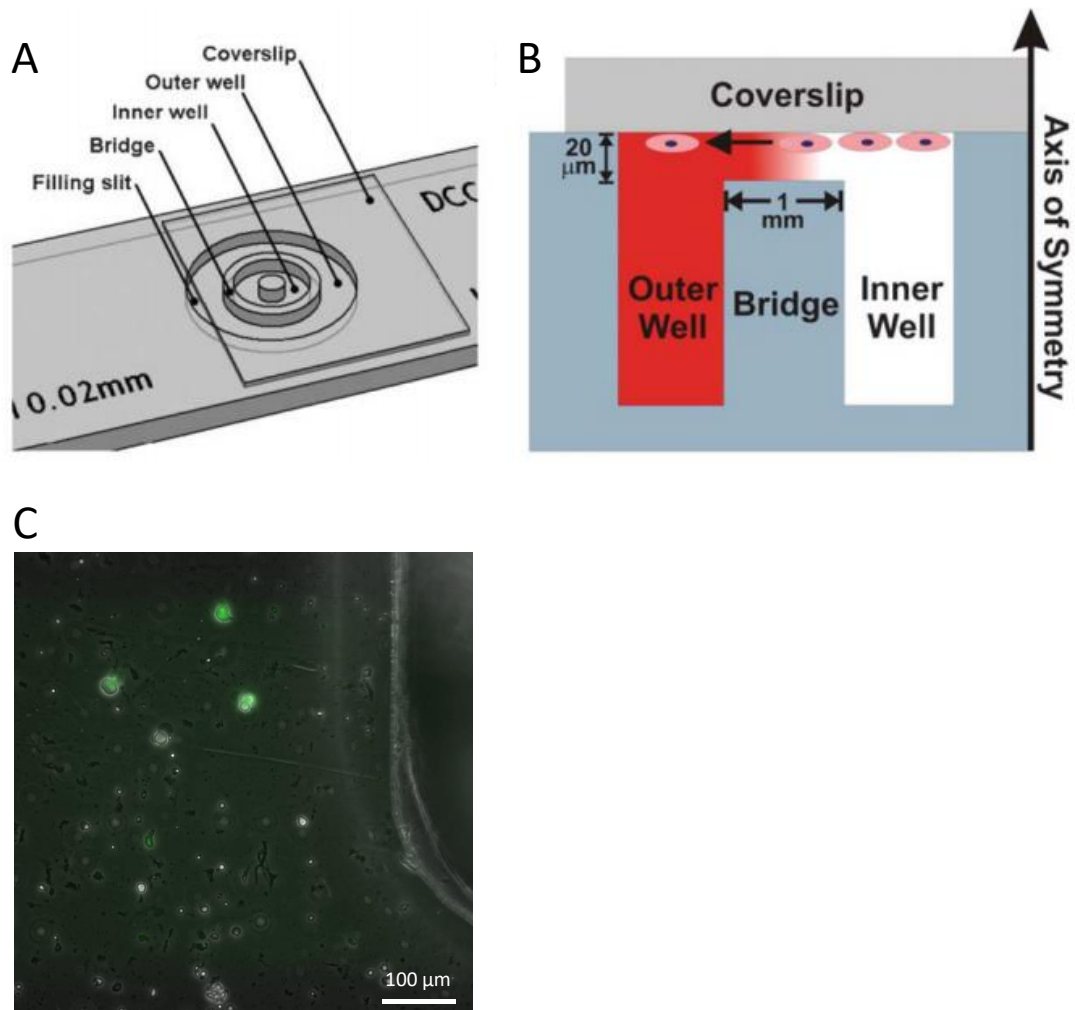


Figure S3. La chambre de Dunn, outils d'évaluation du dynamisme migratoire.

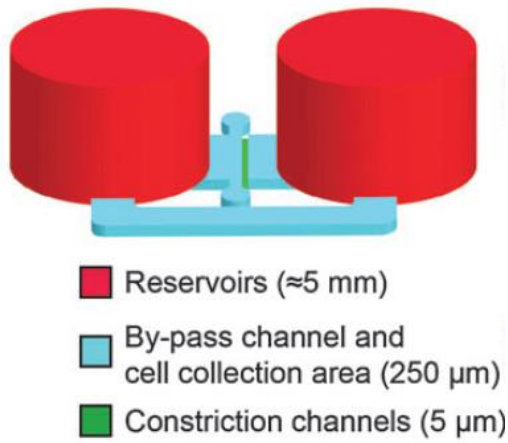
(A)(B) Schéma d'une chambre de Dunn consistant à faire sédimenter des cellules sur une lamelle et de la retourner sur la chambre comportant 2 puits séparés par un pont de 1 mm de largeur, laissant une hauteur de passage de 20 μm pour les cellules. Celle-ci migrent alors du côté interne vers le côté externe selon un gradient chimiotactique. D'après Keenan et Folch, 2007. (C) Images de microscopie à contraste de phase et à épifluorescence montrant des MKs (en vert) fraîchement isolés de moelle de souris Rosa-PF4cre dans une chambre de Dunn. D'après l'UMR_S1255.

3. Discussion et perspectives

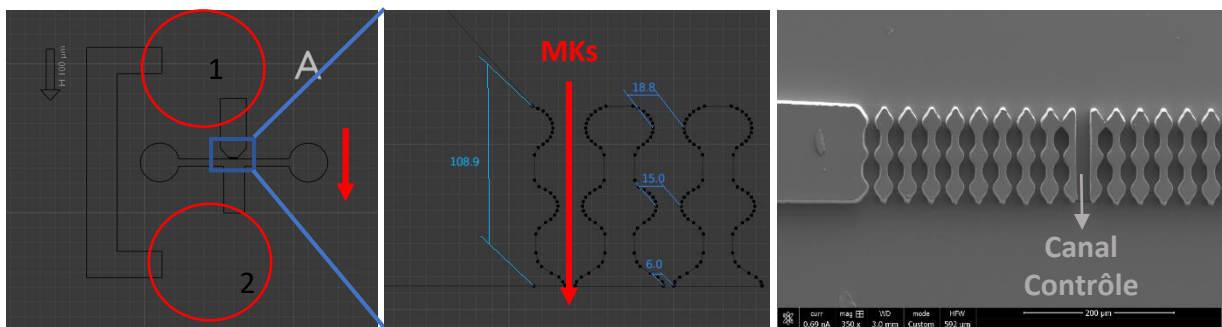
3.1. Transmigration de MKs entiers dans la circulation des souris DKO $Itgb1^{-/-}/Itgb3^{-/-}$. Nos résultats mettent en avant un rôle jusqu'ici insoupçonné des intégrines en tant que régulateurs négatifs de la transmigration des MKs. Par différentes approches d'imagerie (TEM, IF et microscopie intravitale), nous avons observé la présence de MKs DKO entiers dans la lumière des sinusoides. De façon logique, nous avons également noté une augmentation du nombre de noyaux polylobés mégacaryocytaires dans la microcirculation pulmonaire, le premier lit vasculaire recevant le sang en provenance de la moelle. Ces observations peuvent être rapprochées de celles faites par l'équipe de B. Nieswandt montrant qu'une délétion de RhoA conduit également un défaut de transmigration des MKs, avec la présence de 30 % de MKs intrasinusoïdaux présents dans la lumière des vaisseaux. Dans cette étude, les auteurs proposent que la libération des plaquettes sanguines serait régulée par les GTPases : RhoA émettant un signal « stop » et Cdc42 un signal « go », les GTPases se comportant ainsi comme des checkpoints moléculaires³⁸³. Comment expliquer le phénotype similaire des souris $RhoA^{-/-}$ et DKO $Itgb1^{-/-}/Itgb3^{-/-}$? Comme mentionné dans la revue bibliographique (Cf. Chapitres 3.2.1 et 4.1.2), on sait que l'engagement des intégrines stimule l'activité de la GTPase RhoA favorisant notamment la génération des adhérences focales²⁵⁷ (Figure 30) et l'induction des podosomes^{325,328,329} (Figure 44). Ainsi, en contrôlant l'adhérence des MKs à leur microenvironnement, les intégrines et la GTPase RhoA pourraient moduler le passage des MKs dans la circulation générale. Il serait donc intéressant de mesurer directement l'activité de ROCK et de son activateur RhoA dans les MKs DKO.

3.2. Les intégrines permettent l'ancrage des MKs au tissu environnant de la moelle osseuse. Nos expériences d'immunomarquages montrant la présence de zones de contacts riches en intégrine $\beta 1$ activée et fibronectine, ainsi que nos résultats obtenus en adhésion statique et en explants de moelle osseuse, sont en faveur d'un rôle des intégrines dans l'adhérence des MKs dans la moelle osseuse. Pour compléter ces études, nous caractérisons actuellement le rôle des intégrines dans la capacité des MKs à migrer sous l'effet d'un gradient chimiotactique de SDF1 α , en utilisant les chambres de Dunn. Ce modèle consiste à déposer des MKs sur une lamelle recouverte de fibronectine, entre les 2 puits formant le gradient chimiotactique^{269,384}

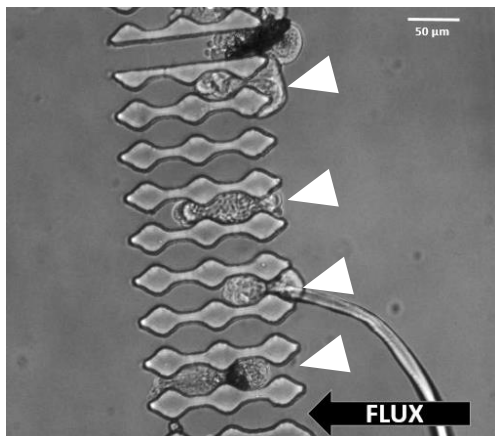
A



B



C



D

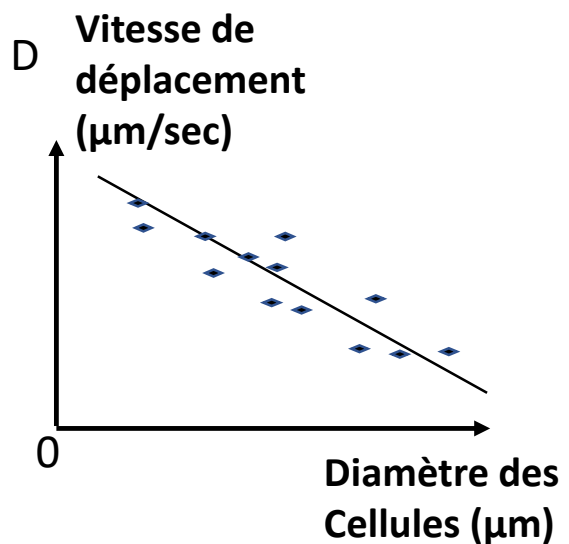
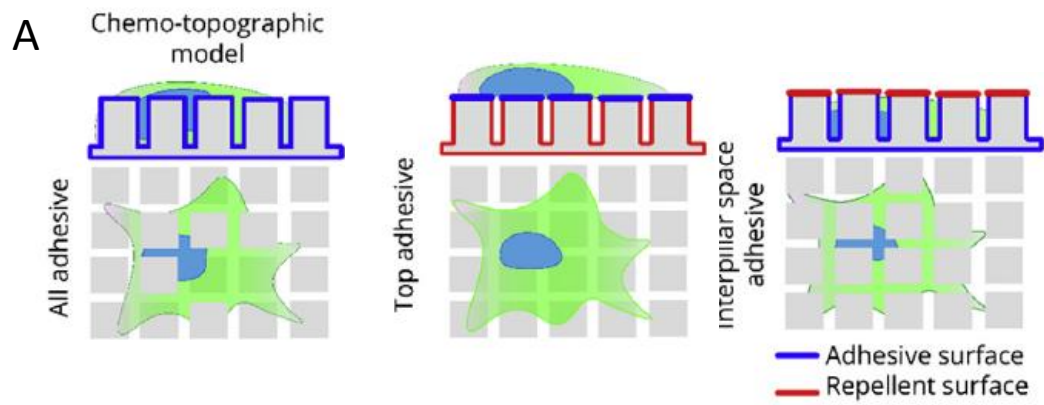


Figure S4. Stratégies d'étude de la déformabilité des noyaux : la chambre de déformabilité.

(A) Modèle de chambre de déformabilité avec réservoirs pour le milieu et la suspension cellulaire, canaux d'irrigation jusqu'à la zone de déformabilité. D'après Davidson et al., 2015. (B) A gauche et au centre, schéma de la chambre de déformabilité développée au laboratoire à partir du modèle de Davidson et al., 2015. Les MKs traverseront des canaux dotés de piliers d'espacement décroissants ($20\text{-}15\text{-}6 \mu\text{m}$) ou de taille unique ($15 \mu\text{m}$) A droite, image de microscopie électronique à balayage montrant les canaux de déformabilité du moule de PDMS généré au laboratoire. D'après l'UMR_S1255. (C) Image de microscopie à contraste de phase montrant des MKs se déformant lors du passage des canaux de déformabilité. D'après l'UMR_S1255. (D) Représentation schématisée de la corrélation entre la vitesse de déplacement et le diamètre des MKs qu'il sera possible de réaliser avec ce modèle.

(Figure S3). La preuve de concept a déjà été réalisée avec des MKs fluorescents isolés de moelle de souris ROSA-PF4cre permettant de corrélérer leur taille (index de maturité) avec leur comportement (migration, statique, étirement cellulaire). Néanmoins, ce modèle ne mime pas le passage au travers d'une monocouche de cellules endothéliales. Il conviendrait donc également d'utiliser un modèle de coculture basé sur un système de transwell permettant de déposer des MKs au contact de la face basale d'une monocouche de cellules endothéliales. A ces fins, N. Brouard a développé au laboratoire des modèles expérimentaux sur cellules murines et mis au point des méthodes robustes permettant d'isoler des populations pures de cellules endothéliales médullaires. Chez la souris, l'utilisation de souris IMMORTOMOUSE® nous a permis d'établir plusieurs lignées de cellules endothéliales médullaires. Ces lignées représentent un outil précieux pour l'étude *in vitro* de la mégacaryopoïèse.

3.3. Rôle des intégrines dans la maturation des MKs. Nous avons constaté que les MKs DKO présentaient des anomalies dans l'organisation du DMS qui ne délimite pas le cytoplasme en petits territoires. On sait qu'un développement anormal du DMS est associé à une diminution du nombre de plaquettes circulantes dans certaines maladies héréditaires hémorragiques (syndrome de Bernard-Soulier, syndrome de May-Hegglin)^{14,76}. Ainsi, cette observation pourrait expliquer, au moins en partie, la thrombopénie observée dans ces souris (diminution de 35% de la numération plaquettaire). Ces résultats contrastent avec les données physiopathologiques observées chez les patients atteints de la thrombasthénie de Glanzmann (mutation ou absence de la $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$) qui ont une numération plaquettaire normale, bien que comprise dans la fourchette basse de la norme. La raison de cette différence n'est pas connue, mais pourrait être due à l'intégrine β1 qui est toujours fonctionnelle chez ces patients, bien que chez nos souris simple KO β3 , la numération plaquettaire soit déjà réduite de 30%. De façon intéressante, les MKs DKO présentent également une plus grande fréquence d'empéripolèse, c'est-à-dire de passage d'une cellule (souvent neutrophile et lymphocyte) à l'intérieur des canaux du DMS (décrit dans le chapitre 1.2.3. de la revue). L'absence d'intégrines pourrait-elle modifier les propriétés physiques des membranes en modulant l'ancrage du cytosquelette sous-membranaire ? Des méthodes de micromanipulations cellulaires (systèmes d'aspiration par micropipette et d'écrasement cellulaire) devraient permettre de répondre à cette question et feront l'objet d'une étude menée par C. Léon, spécialiste de la mécanotransduction dans notre unité.



B

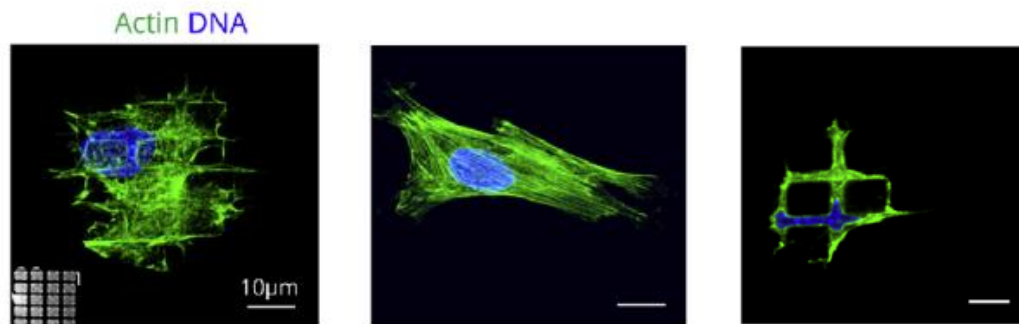


Figure S5. Stratégies d'étude de la déformabilité des noyaux : le modèle des piliers.

Schéma du modèle (A) et images représentatives des différentes configurations possibles selon les coatings utilisés (B). A gauche, les cellules déposées sur les piliers peuvent adhérer à la fois aux piliers et au fond de la chambre. Au centre, les cellules déposées peuvent adhérer uniquement à la surface des piliers. A droite, les cellules déposées peuvent adhérer uniquement au fond du puits et se déformer entre les piliers. A)(B) (A)(B) Adaptés, d'après Tusamda Wakhloo et al., 2020.

3.4. Les intégrines dans le maintien structural du noyau Nous nous sommes ensuite tournés vers le rôle des intégrines dans les propriétés intrinsèques des noyaux des MKs. Ceci est illustré par le passage du noyau polylobé de MKs DKO au travers de pores de diamètre limité (~5-8 μm) lors de leur transmigration. Les reconstructions 3D de ces noyaux montrent l'aspect déplié de leurs lobes nucléaires en comparaison aux noyaux de MKs *wt* qui sont compacts. Ainsi nous proposons que les intégrines contrôlent les propriétés structurales des noyaux telles que leur rigidité, leur organisation et leur polarisation. Cette hypothèse est appuyée par une différence de localisation des lamines A /C qui n'apparaît pas répartie de façon homogène sur toute la périphérie nucléaire comme en condition contrôle. Des études complémentaires de Western Blot nous permettront de définir si ces défauts s'accompagnent (ou non) de différences d'expression des protéines nucléaires, en particulier les lamines A/C, les lamines B ainsi que les histones méthylées. En effet, des études récentes ont montré que l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ jouait un rôle important dans la méthylation de l'histone H3K9 *via* la méthyltransférase G9a, ceci ayant pour effet de réguler la compaction de la chromatine et donc la rigidité du noyau³⁸⁵. D'un point de vue fonctionnel, nous développons actuellement deux modèles *in vitro* en vue de mesurer la déformabilité des noyaux des MKs, 1) au cours de leur passage dans des microcanaux de diamètre calibré selon la chambre décrite par l'équipe de Lammerding²⁷⁵ (Figure S4) et 2) entre des micropilliers sur des surfaces microstructurées décrites par l'équipe de K. Anselme³⁸⁶ (Figure S5). Ceci nous permettra de définir respectivement les cinétiques de passage des MKs et la taille limite de passage. Pour ces études, nous nous sommes rapprochés de biophysiciens spécialistes en micro-fluidique et en analyses d'images afin d'automatiser le suivi cellulaire à partir d'images en contraste de phase ou fluorescence (M. Faivre de l'UMR 5270 à Lyon, Y. Knapp de l'IRPHE à Marseille et L. Pieuchot de l'IS2M à Mulhouse). Si ces tests fonctionnels s'avèrent concluants, nous prévoyons des expériences de CLEM afin de définir avec précision les caractéristiques des noyaux de la population de MKs qui ne restent pas coincés dans les pores (architectures des noyaux, expression/distribution des lamines A/C et B1).

3.5. Limites et difficultés de l'étude. Une difficulté que nous avons rencontrée concerne la génération des souris DKO. En effet, les couples reproducteurs (hétérozygotes pour la cré recombinase) ne donnent que peu de progénitures DKO en raison d'une plus forte létalité avant sevrage. En analysant les proportions des différents génotypes obtenus (souris cré positives et cré négatives) par les couples, nous estimons à seulement 30% le nombre de naissances DKO viables (contre 50 % attendues) pouvant être expliqué par des saignements *in utero* ou périnataux des souriceaux. Ce faible nombre de souris disponibles a ainsi en partie limité nos expériences.

**Axe 3. Déterminer si une
activité de dégradation de la
matrice extracellulaire est
nécessaire au passage
transendothélial des MKs**

1. Résumé de l'étude

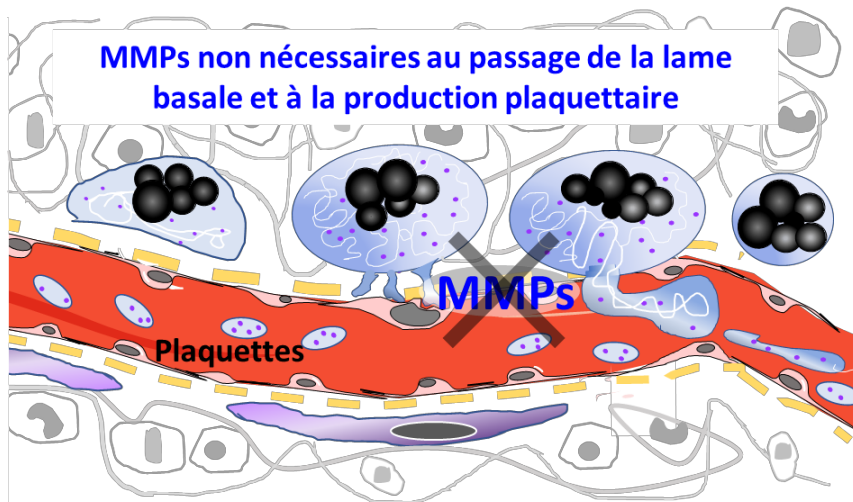
Une dégradation de la matrice extracellulaire est-elle nécessaire pour que les MKs puissent traverser l'endothélium ? Nos expériences d'immunomarquage de la lame basale indiquent l'existence d'espaces exempts de protéines matricielles. Nous formulons ainsi l'hypothèse d'une dégradation de la lame basale par les métalloprotéases de la famille des MMPs (*matrix metalloproteinase*).

Parmi les MMPs présentes dans les MKs, nous avons d'abord ciblé la MT1-MMP parce qu'il s'agit de l'isotype le plus exprimé par les MKs humains (étude transcriptomique dirigée par C. Strassel et H. de la Salle) et qu'elle a été décrite comme jouant un rôle crucial dans l'invasion cellulaire. Nous avons commencé à étudier sa distribution subcellulaire en utilisant la technique d'immunomarquage aux billes d'or en microscopie électronique. Nos observations indiquent que la MT1-MMP est essentiellement localisée sur la membrane des granules α . L'analyse détaillée de MKs en cours de transmigration ne permet pas de détecter l'enzyme à l'interface MK-sinusoïde, une région susceptible d'être soumise à la dégradation enzymatique. Afin d'évaluer un rôle possible de cette enzyme, nous avons ensuite analysé la moelle de souris déficientes en MT1-MMP (collaboration S. Weiss, Michigan, USA). Nos observations en microscopie électronique montrent que les MKs de ces souris se comportent de façon normale (apposition aux sinusoides, émission de podosomes invasifs, transmigration, aspect normal de la lame basale). La lame basale des sinusoides médullaires de ces souris apparaît également interrompue comme pour les souris WT. Ainsi, ces données semblent indiquer que la **MT1-MMP n'est pas primordiale dans la pénétration des MKs au travers de la lame basale.**

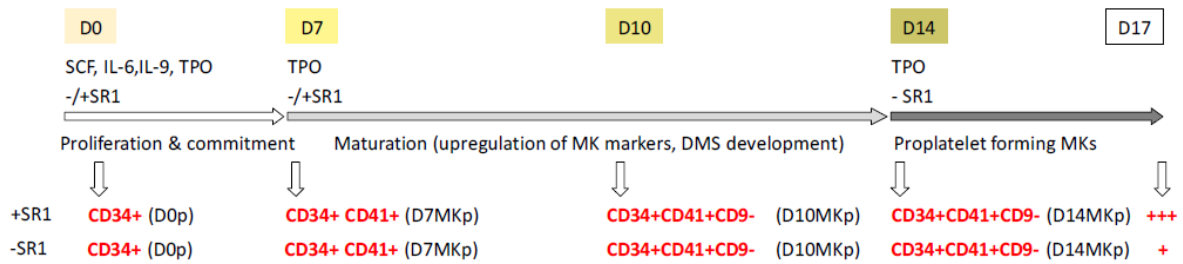
La MT1-MMP n'étant pas la seule MMP exprimée par les MKs, d'autres MMPs pourraient intervenir dans la dégradation de la lame basale. Nous avons ainsi souhaité évaluer, de manière plus globale, l'activité enzymatique des MMPs mégacaryocytaires dans un modèle de MKs matures natifs déposés sur une matrice de collagène fluorescent. Nos conclusions indiquent que les MKs matures directement issus de la moelle ne dégradent pas la matrice extracellulaire, alors que dans notre contrôle positif, des cellules tumorales invasives, on observe des plages sombres sous les cellules indiquant la dégradation de la matrice. Enfin, nous avons voulu savoir si l'activité des MMPs était impliquée dans la production des

plaquettes sanguines *in vivo*. Pour cela, nous avons suivi la numération plaquettaire de souris traitées pendant 7 jours avec le GM6001, un inhibiteur à large spectre des MMPs. L'efficacité du traitement a été validée par dosage des MMPs actives dans le plasma. Nos résultats montrent que le **traitement *in vivo* par le GM6001 n'affecte pas la numération plaquettaire.**

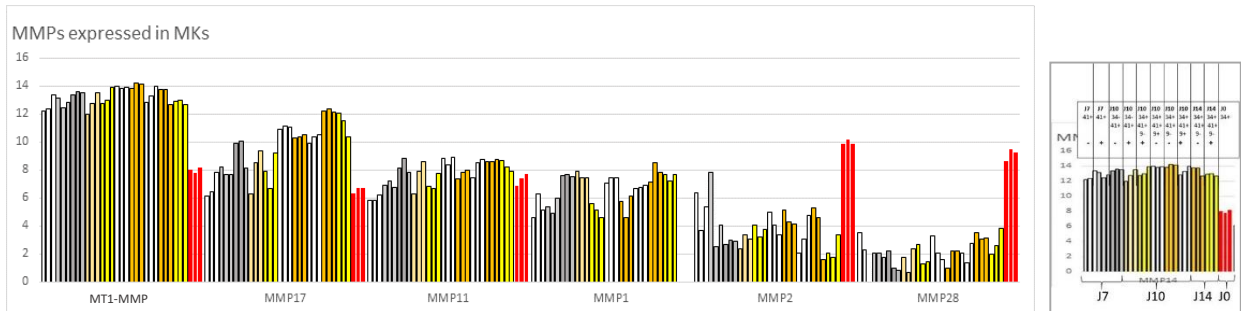
En conclusion, l'ensemble de nos résultats suggère fortement que les **MMPs ne soient pas nécessaires au passage de la lame basale et à la production des plaquettes sanguines.** Ces résultats questionnent alors sur la possibilité que les podosomes utilisent uniquement la force pour déplacer les protéines de la lame basale. Ce travail met également en lumière les différences de résultats expérimentaux entre les études utilisant des MKs cultivés *in vitro* ou isolés fraîchement de moelle osseuse et de la nécessité de générer des modèles au plus près du microenvironnement natif.



A



B



Annexe 1 : Expression des MMPs par les mégacaryocytes humains de cultures.

(A) Les cellules CD34+ ont été cultivées en deux étapes et en présence ou en absence de StemRegenin1 (SR1), une molécule favorisant l'émergence de la population proplaquetogène (Strassel et al., 2016). Les cellules CD34+ sont caractérisées selon les marqueurs CD41, CD9 lors des différentes phases de cultures, la population CD34+ CD41+ CD9- étant la plus proplaquetogène. Les quantités de transcrits ont été mesurées à 3 stades de maturations différents, dans 1) les progéniteurs CD34+ obtenus après tri immunomagnétique positif à J0, 2) les cellules immatures CD34+ CD41+ à J7 et J10 et 3) les MKs proplaquetogènes CD34+CD41+CD9- à J14.

(B) Quantité de transcrits ARN exprimés par des MKs CD34+ à différents jours de cultures (encart à droite), valeurs en log2 du nombre de lectures normalisées sur la série de données et la longueur des transcrits de référence. Les résultats montrent que les progéniteurs CD34+ (barres rouges) expriment majoritairement les MMP-2 et MMP-28 alors que les cellules engagées ou proplaquetogènes expriment majoritairement la MT1-MMP dès le 7^e jour de culture.

2. Résultats

Les métalloprotéases ne participent pas significativement à la transmigration des MKs

1. Introduction

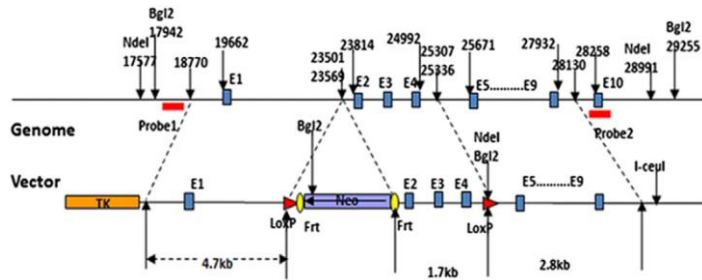
Afin de libérer les plaquettes sanguines, les MKs traversent la barrière des sinusoides comportant deux composantes, une lame basale et une monocouche de cellules endothéliales. Dans le premier axe de ma thèse, nous avons montré qu'*in situ*, pour traverser l'endothélium, les MKs formaient des *in vivo*-podosomes afin de créer des pores transcellulaires pouvant ensuite fusionner et former des ouvertures de taille plus importante. Dans le second axe, nous avons montré que les intégrines régulent négativement la transmigration en permettant l'ancrage et le maintien structural du MK lors de son passage. Dans cette partie, nous allons focaliser notre attention sur la lame basale qui compose les sinusoides afin de comprendre le franchissement de cette barrière.

En microscopie électronique, Inoue et Osmond avaient fait l'observation du caractère irrégulier de la lame basale, composée de matière « amorphe » le long des sinusoides²⁰³. En 2013, Schachtner et collaborateurs montrent que les MKs murins forment *in vitro* des podosomes dotés d'une activité de dégradation du fibrinogène par l'intermédiaire des MMPs¹⁴⁰. Ces observations ont amené les auteurs à conclure que c'est par le biais de cette activité enzymatique médiée par les podosomes que les MKs franchissent la lame basale des sinusoides. De façon cohérente, des analyses transcriptomiques générées au laboratoire par H. de la Salle et par d'autres équipes montrent que les MKs en cultures issues de CD34+ expriment certaines MMPs^{362,363}. En effet, nos résultats illustrés dans [l'annexe 1](#) montrent que les progéniteurs CD34+ (barres rouges) expriment majoritairement les MMP-2 et MMP-28 alors que les cellules engagées ou proplaquetogènes (barres grises et oranges) expriment majoritairement la MT1-MMP dès le 7^e jour de culture. La MT1-MMP est une enzyme transmembranaire s'accumulant au niveau des invadopodes des cellules invasives et jouant un rôle essentiel dans leur formation et leur fonction protéolytique^{302,354,355,387}. Elle participe ainsi à la migration et l'invasion cellulaire, à la transition épithélio-mésenchymateuse et

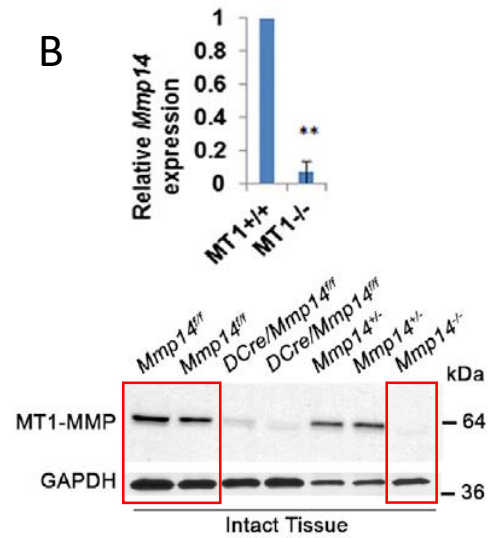
favorise la carcinogénèse mammaire *in vivo*^{350,352}. Trois modèles de souris déficientes pour la MT1-MMP ont été rapportés dans la littérature et ces animaux meurent tous de cachexie avant le quinzième jour de vie³⁸⁸⁻³⁹¹. Ces souris présentent un nanisme associé à une ostéopénie, un défaut de remodelage des tissus mous avec accumulation de fibrilles de collagène I³⁸⁸. *In vitro*, il a été montré que les cellules dendritiques MT1-MMP^{-/-} émettaient des podosomes moins longs au travers de la matrice, associées à une diminution de la dégradation et de la largeur de pores au travers de la matrice³⁰² et que le nombre de cellules tumorales MT1-MMP^{-/-} formant des invadopodes était réduit de moitié³⁵⁴. De façon intéressante, une numération plaquettaire réduite de 50 % a été décrite pour l'un des trois modèles de souris MT1-MMP^{-/-}³⁹¹, alors qu'elle n'est pas rapportée pour les deux autres souris transgéniques. La thrombopénie serait due à une myélofibrose, induite par une accumulation du collagène I dans les moelles de ces souriceaux et conduisant à une pancytopénie (cytopénie de toutes les cellules sanguines)^{388,391}.

L'objectif de cette étude vise à évaluer la contribution des MMPs dans la transmigration des MKs. Nous avons d'abord focalisé notre attention sur la MT1-MMP parce qu'il s'agit de l'isoforme la plus exprimée dans les MKs et en raison de ses propriétés connues dans l'invasion cellulaire. Pour cela, nous avons étudié la localisation de la MT1-MMP dans des MKs au contact des sinusoides et analysé des moelles osseuses fixées de souriceaux MT1-MMP^{-/-} obtenues dans le cadre d'une collaboration avec S. Weiss (Michigan, USA). Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé le rôle global de toutes les MMPs par des études *in vitro* de digestion enzymatique et *in vivo* par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique à large spectre, la GM6001. Nos principaux résultats montrent que 1. la MT1-MMP ne semble pas requise pour la formation des podosomes invasifs, 2. les MKs matures fraîchement isolés de la moelle ne dégradent pas la matrice extracellulaire et 3. l'inhibition pharmacologique des MMPs *in vivo* n'affecte pas à la production plaquettaire.

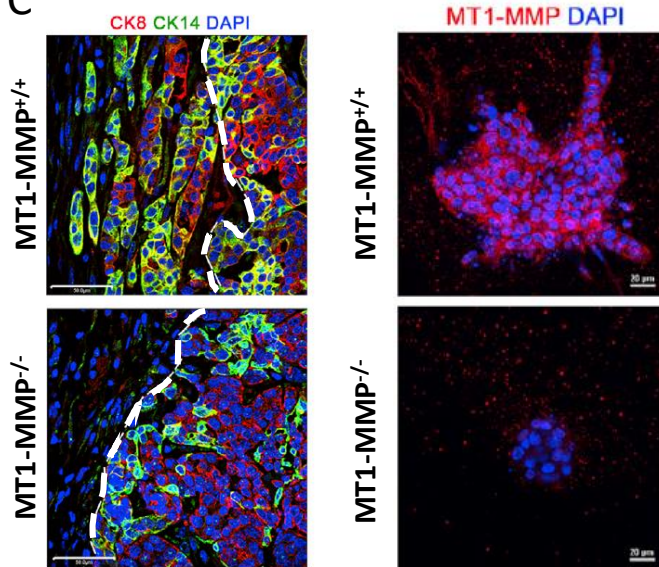
A



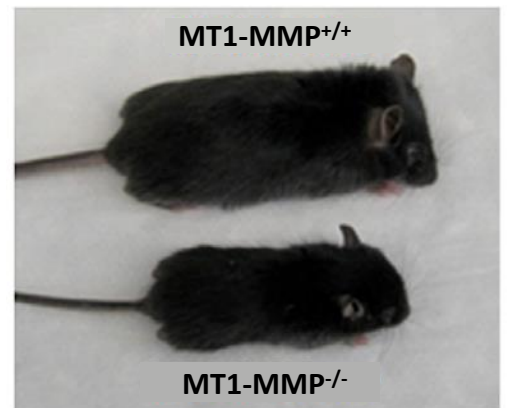
B



C



D



Annexe 2 : La MT1-MMP est nécessaire à l'invasion tumorale des carcinomes mammaires.

(A) Représentation schématique du locus génomique de *Mmp14* codant pour la MT1-MMP et du vecteur construit pour entourer les exons 2 à 4 de sites LoxP. D'après Tang et al., 2013. (B) En haut, expression relative de la MT1-MMP déterminée par RT-PCR sur les cellules MT1-MMP^{+/+} et MT1-MMP^{-/-}. D'après Tang et al., 2013. En bas, niveau d'expression protéique de la MT1-MMP normalisé sur la GAPDH de différents modèles dont MT1-MMP^{+/+} et MT1-MMP^{-/-} en encadrés rouges. Adapté, d'après Feinberg et al., 2018. (C) A gauche, les cellules carcinomateuses MT1-MMP^{+/+} (en haut) positives aux cytokératines CK8/CD14 (à gauche) ou marquées RFP (souris ROSA, à droite) sont retrouvées dans le stroma environnant. La délétion de la MT1-MMP (en bas) abolit l'invasion du tissu stromal (lame basale en pointillés blanc). A droite, des organoïdes carcinomateux, ont été cultivés *ex vivo* dans un hydrogel de collagène I. Après 4 jours de culture, la MT1-MMP (en rouge, à droite), marquée avec le clone EP1264Y, est présente sur des organoïdes de cellules carcinomateuses MT1-MMP^{+/+} (en haut) mais absente sur les organoïdes de cellules carcinomateuses MT1-MMP^{-/-} (en bas). Adapté, d'après Feinberg et al, 2018. (D) Phénotype de nanisme de la lignée MT1-MMP^{-/-}. Adapté, d'après Tang et al, 2013.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Modèle de souris. Les souris C57BL/6 contrôles sont hébergées à l'animalerie de l'EFS selon l'agrément n° : G-67-482-10 et le prélèvement des fémurs et tibias sur les souris euthanasiées se déroule dans des conditions conformes aux normes européennes 2010/63/UE.

Les souris *Mmp14^{ff}* de fond génétique FVB/NJ et C57BL/6 ont été générées par S. Weiss³⁹², les exons 2 à 4 du domaine catalytique ont été floxés avec des sites loxP. Les souris homozygotes *Mmp14^{ff}* ont ensuite été croisées avec des souris MMTV-cre (promoteur ubiquitaire) pour donner des souris *Mmp14^{-/-}* (notées MT1-MMP^{-/-})³⁵⁰ (Annexe 2A et 2B). Cette lignée a été générée par l'équipe de S. Weiss afin d'évaluer les mécanismes d'invasion et de remodelage de la MEC en conditions de morphogénèse normale ou de progression carcinomateuse mammaire. La principale observation est que la MT1-MMP est nécessaire à l'invasion cancéreuse et la progression métastatique³⁵⁰ (Annexe 2C). Les souriceaux MT1-MMP^{-/-} souffrent de nanisme à partir du jour 5 post-natal et décèdent entre les jours 12 et 15 par défaut de développement vasculaire et osseux associé à une fibrose³⁸⁸ (Annexe 2D). La taille des souris rend alors le flush de la moelle impossible. Les tibias et fémurs entiers de souriceaux de 10 jours nous ont été envoyés après fixation soit au glutaraldéhyde 2,5%, soit avec un mélange paraformaldéhyde 2%-glutaraldéhyde 0,2% par le laboratoire de S. Weiss (Michigan, USA). La numération plaquettaire de ces souris n'est pas connue.

2.2. Microscopie électronique à transmission sur coupes de moelles osseuses ou os décalcifiés.

Les moelles osseuses et les os entiers sont fixés au glutaraldéhyde 2,5%. Les os entiers sont décalcifiés en PBS-EDTA 10% pendant 1 semaine sous agitation à 4°C. Les échantillons sont ensuite rincés en tampon cacodylate, enrobés d'agarose, post-fixés au tétroxyde d'osmium 1%, incubés en acétate d'uranyl 4% avant d'être déshydratés par bains croissants d'éthanol. Les blocs sont ensuite inclus dans la résine époxy. Des coupes transversales ultrafines (100 nm) sont réalisées, contrastées aux métaux lourds (acétate d'uranyl 4%, citrate de plomb) et observées avec le microscope électronique à transmission JEOL 2100 Plus (JEOL, Japon) à 120 kV. Nous avons analysé les moelles provenant au moins de 3 souris différentes par lignée.

2.3. Préparation des moelles osseuses pour la cryo-ultramicrotomie. Après prélèvement des os, les moelles osseuses de souris C57BL/6 sont flushées, fixées avec un mélange de paraformaldéhyde 2% et de glutaraldéhyde 0,2%, avant d'être enrobées en gélatine 10% puis infusées dans le sucrose 2.3M et congelées dans l'azote liquide selon la méthode de Tokuyasu³⁹³. Les os entiers de souris MT1-MMP^{-/-} et leurs contrôles sont décalcifiés en PBS-EDTA 10% pendant 1 semaine sous agitation à 4°C avant d'être enrobés en gélatine 10%, infusés dans le sucrose 2,3M et congelés dans l'azote liquide.

2.4. Immunofluorescence sur coupe fines de moelle. Des sections de moelle osseuse d'une épaisseur de 250 nm sont coupées à l'aide d'un cryo-ultramicrotome et déposées sur des lamelles de verre (0,13mm d'épaisseur, 72192-75, EMS, USA). Après un lavage à l'eau, les coupes sont traitées au PBS-glycine 0.2% et incubées dans une solution de blocage (Tris-Tween 0,05%-BSA 0,1%). Puis on incube la solution d'anticorps primaires anti-laminine (L9393), anti-fibronectine (ab2413), anti-collagène IV (ab6586), anti-perlécan (A7L6), ou anti-MT1-MMP (EP1264Y) dilués en solution de blocage, durant la nuit à 4°C. Après lavage, l'anticorps secondaire approprié couplé en Alexa-647 ou Alexa-680 ainsi que si nécessaire l'anticorps primaire couplé anti-GPIIb β -Alexa 568 sont ajoutés pendant 30 min. Après plusieurs lavages, les coupes sont montées sur des lames avec du liquide de montage Prolong Gold contenant du DAPI. Les coupes sont ensuite observées au microscope confocal Leica SP8 (Leica, Wetzlar, Allemagne) à un objectif x63. Trois expériences d'immunomarquages indépendants ont été réalisées pour chaque condition (n=3) et les analyses d'images ont été effectuées avec les logiciels Image J-Fiji (version 1.52q) et Leica Las-X (version 3.3.3).

2.5. Localisation de la MT1-MMP par immunomarquages aux billes d'or. Des sections de moelle osseuse d'une épaisseur de 100 nm sont coupées à l'aide d'un cryo-ultramicrotome et déposées sur des grilles en nickel (formvar carbone). Ces grilles sont ensuite incubées coté coupe sur de la gélatine 2% pendant 30 min à 37°C. Après lavages sur du PBS à 37°C, les grilles sont successivement incubées sur des gouttes de PBS-Glycine 0,2% et de solution de blocage à la PBS-BSA 1%. Puis les grilles sont déposées sur la solution d'anticorps primaire anti-MT1-MMP (EP1264Y) ou de son isotype contrôle à 10 μ g/mL en PBS-BSA 1% pendant 30 min. Les grilles sont ensuite lavées en PBS-BSA 1% et déposées sur la solution secondaire de protéine A couplées aux billes d'or (PAG 10) en BSA 1%. Les grilles sont rincées sur gouttes de PBS-BSA

1%, et lavées sur du PBS. Une fixation au PBS-glutaraldéhyde 1% permet de fixer les billes d'or avant un rinçage au PBS et des lavages à l'eau distillée. Les grilles sont ensuite contrastées sur un mélange de méthylcellulose-acétate d'uranyl 0,4% placé sur glace, à l'obscurité. L'excédent de méthylcellulose est ensuite éliminé sur filtre buvard imbibé d'eau distillée, les grilles sont séchées sur oese puis observées avec le microscope électronique à transmission JEOL 2100 Plus (JEOL, Japon) à 120 kV. Trois expériences d'immunomarquages indépendants ont été réalisées pour chaque condition (n=3).

2.6. Immunofluorescence sur coupe épaisses de moelle. Après prélèvement des os, les moelles osseuses de souris C57BL/6 sont flushées, fixées avec du paraformaldéhyde 4%, avant d'être enrobées d'agarose 4%. Les os entiers de souris MT1-MMP^{-/-} et leurs contrôles sont décalcifiés en PBS-EDTA 10% pendant 1 semaine sous agitation à 4°C, avant d'être enrobés d'agarose 4%. Des sections transversales de moelle osseuse ou d'os entiers d'une épaisseur de 250 µm sont coupées à l'aide d'un vibratome (Leica, Wetzlar, Allemagne) et déposées sur des lamelles en verre. Après une incubation en solution de blocage (Tris-Tween 0,05%-BSA 0,1%) pendant 30 min, les coupes sont lavées en tampon Tris puis incubées avec l'anticorps primaire anti-laminine (L9393), dilué dans la solution de blocage, pendant la nuit à 4°C. Après une série de lavages au tampon Tris, l'anticorps secondaire couplé Alexa 680 est incubé pendant la nuit à 4°C. Après plusieurs lavages au Tris, les coupes sont incubés 10 min avec du Hoechst, lavées et montées sur des lames avec du liquide de montage Mowiol. Les coupes sont ensuite observées au microscope confocal Leica SP8 (Leica, Wetzlar, Allemagne) à un objectif x63. Trois expériences d'immunomarquages indépendants ont été réalisées pour chaque condition (n=3) et analysées avec Leica Las-X (version 3.3.3).

2.7. Inhibition systémique in vivo des MMPs. Cette procédure a été réalisée en accord avec les normes européennes 2010/63/UE de bien-être animal autorisant le projet n° 2019012313026890. Cette étude a été réalisé sur la base de travaux publiés dans la littérature³⁹⁴⁻³⁹⁷. Ainsi, les souris C57BL/6 ont été traitées quotidiennement par injection intrapéritonéale de GM6001 (20 mg/kg, 50 mg/kg ou 100 mg/kg) ou avec le véhicule carboxyméthylcellulose 4%. Pour la numération plaquettaire, l'extrémité de la queue est sectionnée et 7µL de sang sont prélevés en EDTA 12 mM avant la première injection au jour 1 (J1) puis à J2, J4, J6 et J8. Au jour 8, un prélèvement terminal à l'aorte est réalisé sur citrate

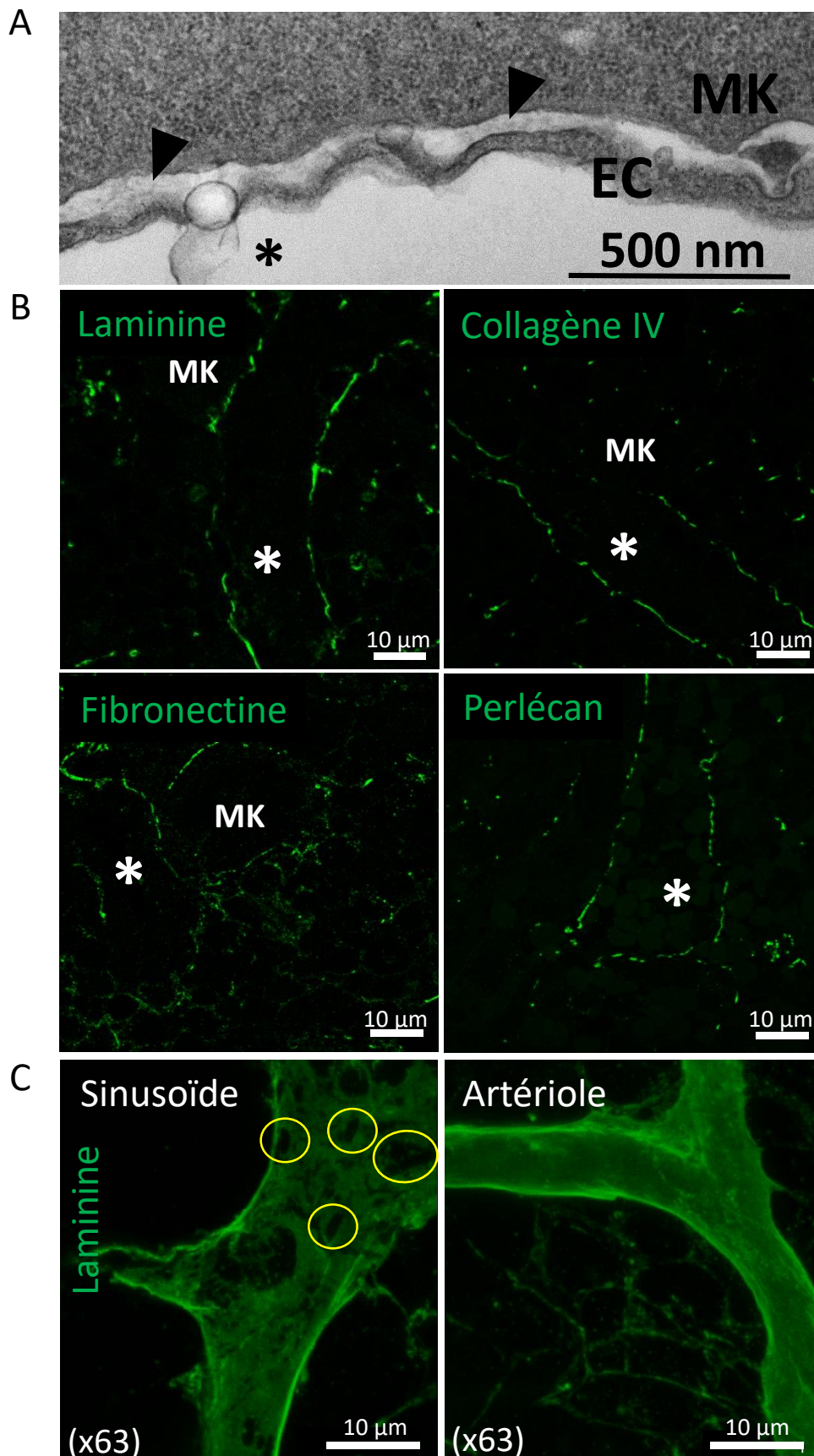


Figure 1 : Les protéines de matrice de la lame basale sont réparties de façon discontinue au niveau des sinusoides.

(A) Image représentative de MET d'une coupe de MO contrôle montrant la lame basale discontinue du sinusoides, * : lumière du sinusoides. La lame basale apparait en grisé et est indiquée par les têtes de flèches. (B) Des cryosections de moelles osseuses de souris contrôle ont été immunomarquées avec l'anticorps anti-laminines ou anti-fibronectine ou anti-collagène IV ou anti-perlecan puis observées au microscope confocal, * : lumière du sinusoides. Images représentatives montrant l'organisation discontinue des protéines majoritaires de la MEC au niveau de la lame basale des sinusoides. (C) Projections maximales d'images de microscopie confocale de coupes épaisses de MO contrôle d'un immunomarquage de la laminine révélant des ouvertures dans la lame basale du sinusoides (indiqués par les cercles jaunes) par opposition à l'artériole.

0,38% final, le plasma est récupéré par centrifugations et les os sont prélevés. Les dosages plasmatiques ont été réalisés en ELISA compétitif et Bradford en collaboration avec Sylvie Brassart-Pasco, UMR CNRS/URCA 7369, Reims, France selon la méthode précédemment décrite³⁹⁸. Pour la dose-réponse 2 souris par condition ont été traitées. Pour la dose 20 mg/kg, 3 souris par condition ont été traitées au cours de 5 expériences indépendantes (n=15) et pour la dose 50 mg/kg, 3 souris par condition ont été traitées au cours de 2 expériences indépendantes (n=6).

2.8. Localisation de la MT1-MMP sur des MKs formant des podosomes in vitro. Après prélèvement des os, les moelles osseuses de souris C57BL/6 sont flushées et incubées dans une solution de collagénase I à 2,3 mg/mL pendant 5 min à 37°C avant d'être vortexées. Le surnageant est prélevé et la collagénase est arrêtée par ajout à v/v de DMEM-PSG1%-SVF 10%. Les moelles sont incubées une seconde fois dans la collagénase pendant 5 min pour une dissociation totale. L'ensemble des surnageants en DMEM-PSG1%-SVF 10% est centrifugé à 350 g pendant 7 min puis resuspendu en DMEM-PSG1%-SVF 10% contenant du Sir-Actine 100 nM. Pour l'observation des podosomes, des cupules ibidis 35 mm *microdishes* sont recouvertes de gélatine conjuguée à l'Oregon Green 488. Les MKs natifs de la moelle sont incubés 3h au contact de la gélatine puis les cellules non adhérentes éliminées par rinçage au PBS. Les MKs adhérents sont fixés au paraformaldéhyde 4%, puis perméabilisés au Triton 0,3% et incubés avec l'anticorps primaire anti-MT1-MMP (EP1264Y) ou de son isotype contrôle à 10 µg/mL pendant 30 min. Après lavages, l'anticorps secondaire adapté et couplé Alexa 647 est ajouté ainsi que l'anticorps anti-GPIIb-Alexa 568. Après lavage les ibidis sont montées avec du liquide de montage Prolong Gold contenant du DAPI. Les MKs adhérents sont ensuite observés au microscope confocal Leica SP8 (Leica, Wetzlar, Allemagne) à un objectif x63. Trois expériences indépendantes ont été réalisées pour chaque condition (n=3).

2.9. Dégradation de la fibronectine fluorescente in vitro. Après prélèvement des os, les moelles osseuses de souris C57BL/6 sont flushées et incubées dans une solution de collagénase I à 2,3 mg/mL pendant 5 min à 37°C avant d'être vortexées. Le surnageant est prélevé et la collagénase est arrêtée par ajout à v/v de DMEM-PSG1%-SVF 10%. Les moelles sont incubées une seconde fois dans la collagénase pendant 5 min pour une dissociation totale. L'ensemble des surnageants en DMEM-PSG1%-SVF 10% est centrifugé à 350 g pendant 7 min puis

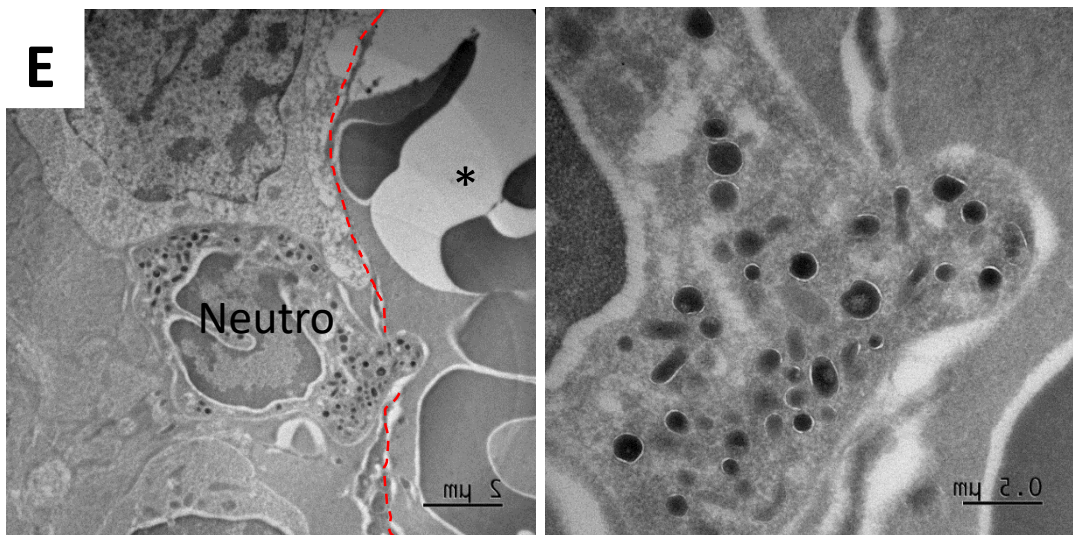
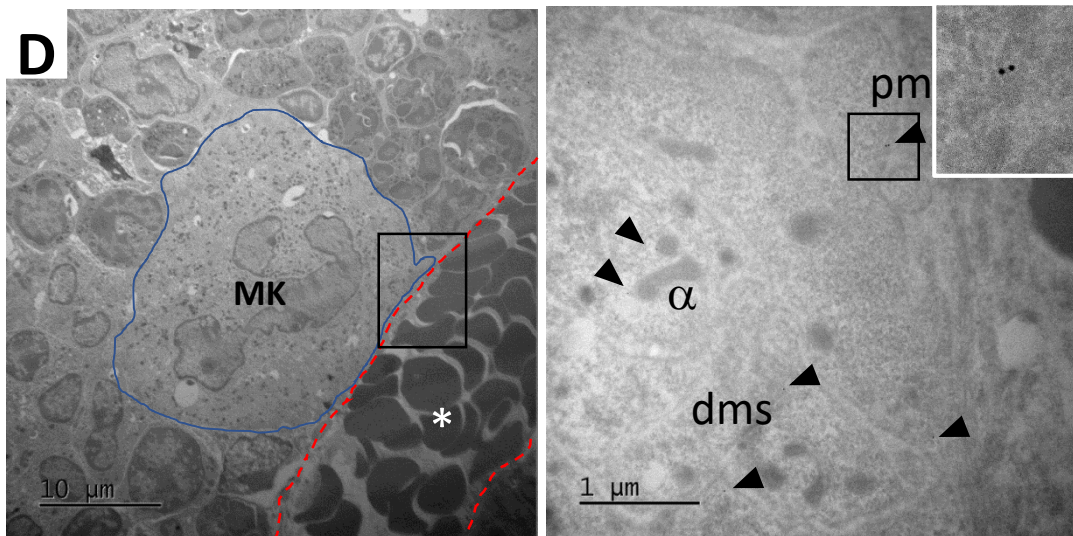
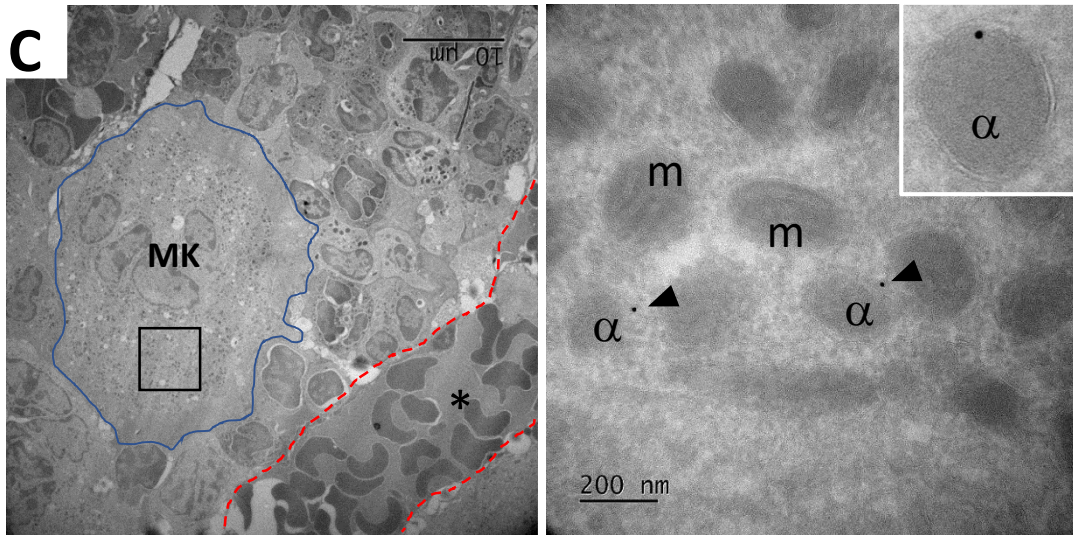
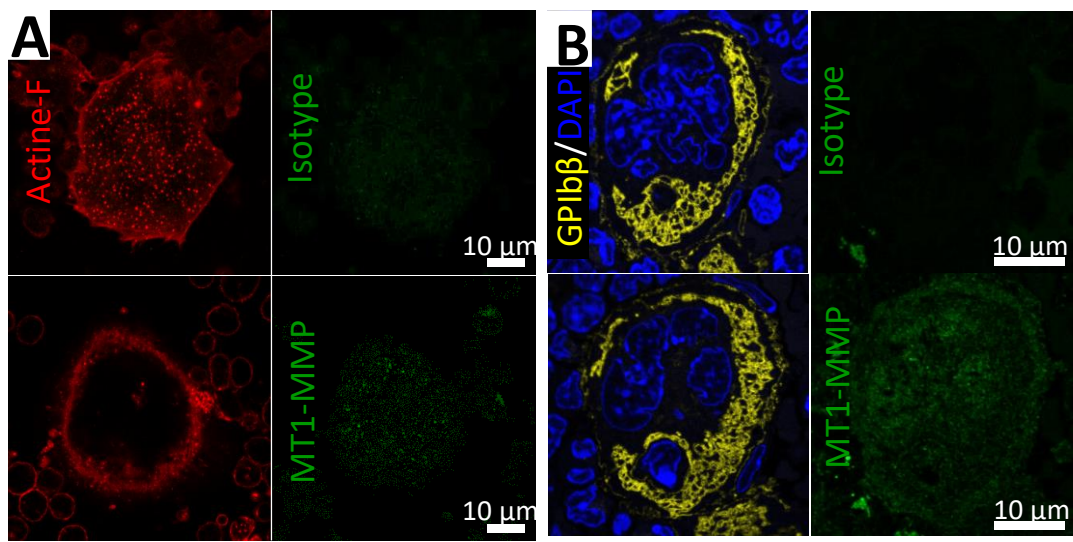


Figure 2.
Cf. page suivante

resuspendu en DMEM-PSG1% contenant du Sir-Actine 100 nM et du SDF-1 250 ng/mL. Une suspension de cellules 4T1, lignée cancéreuse issue de glandes mammaires de souris, est utilisée en contrôle positif et préparée en milieu RPMI-10% SVF contenant du Sir-Actine 100 nM. Pour l'analyse de la dégradation, des lamelles 12 mm sont recouvertes de fibronectine plasmatisque bovine conjuguée à l'HiLyte Fluor 488 (Cytoskeleton) pendant la nuit à 4°C. Les lamelles sont ensuite couvertes respectivement de DMEM-PSG1%-10% SVF pour la suspension de MKs ou de RPMI-10% SVF pour les 4T1, pendant 1h à température ambiante, avant d'être lavées au PBS (Selon Schachtner *et al.*, 2013)¹⁴⁰. Les MKs natifs de la moelle et les cellules 4T1 sont incubées 4h sur les lamelles au contact de la fibronectine puis les cellules non adhérentes éliminées par rinçage au PBS. Les cellules adhérentes sont fixées au paraformaldéhyde 4%, puis incubés avec l'anticorps anti-GPIIb β -Alexa 568 pour les MKs ou du Cell Mask Orange pour les 4T1. Après lavage les ibidis sont montées avec du liquide de montage Prolong Gold contenant du DAPI. Les cellules sont ensuite observées au microscope confocal Leica SP8 (Leica, Wetzlar, Allemagne) à un objectif x63. Trois expériences indépendantes ont été réalisées pour chaque condition (n=3).

2.10. Statistiques. Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel PrismGraphpad (La Jolla, CA, USA). Afin de comparer les numérations plaquettaires des différents groupes de souris au cours du temps, la distribution des données a été analysée par un test d'analyse de variance ANOVA à deux facteurs suivi d'un post test de Bonferroni. Des P-valeurs < 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives. *P<0,05 ; **P<0,01 ; ***P<0,001.

Figure 2 : La MT1-MMP est localisée au niveau de la membrane des granules α des MKs indépendamment du type de contact avec le sinusoïde.

(A) Des MKs issus de la moelle de souris contrôles ont été déposés *in vitro* sur une matrice de gélatine pendant 3h, marqués avec la sonde anti-actine Sir-Actine (en rouge) et observés au microscope confocal. A gauche, les MK formant des podosomes (en rouge). A droite, l'image des mêmes MKs avec le marquage correspondant à l'anticorps anti-MT1-MMP ou son isotype (en vert).

(B) Des cryosections de moelles osseuses de souris contrôle ont été immunomarquées avec l'anticorps anti-MT1-MMP ou son isotype (en vert), l'anticorps anti-GPIIb β (montrant la membrane plasmique du MK, en jaune), du DAPI (en bleu) et observées au microscope confocal. A gauche, la visualisation des MKs en jaune et à droite, l'image des mêmes MKs correspondant au marquage MT1-MMP en vert.

(C)(D) Des cryosections de moelles osseuses de souris contrôle ont été déposées sur grilles, immunomarquées aux billes d'or avec l'anticorps anti-MT1-MMP puis observées en MET. α : granules alpha; pm : membrane plasmique; m : mitochondrie; * : lumière du sinusoïde. A gauche, images de MKs (délimité en bleu) isolé ou en contact avec le sinusoïde (pointillés rouges). A droite, zoom sur la zone encadrée à droite, les têtes de flèche indiquent les billes d'or. Encart à droite, très fort grossissement montrant les billes d'or.

(E) Des cryosections de moelles osseuses de souris contrôle ont été déposées sur grilles, immunomarquées aux billes d'or avec l'anticorps anti-MT1-MMP puis observées en MET. neutro: neutrophile; * : lumière du sinusoïde. Images représentatives d'un neutrophile en cours de transmigration au travers du sinusoïde (pointillé rouge). A droite, fort grossissement sur l'extension invasive dépourvue de marquage anti-MT1-MMP.

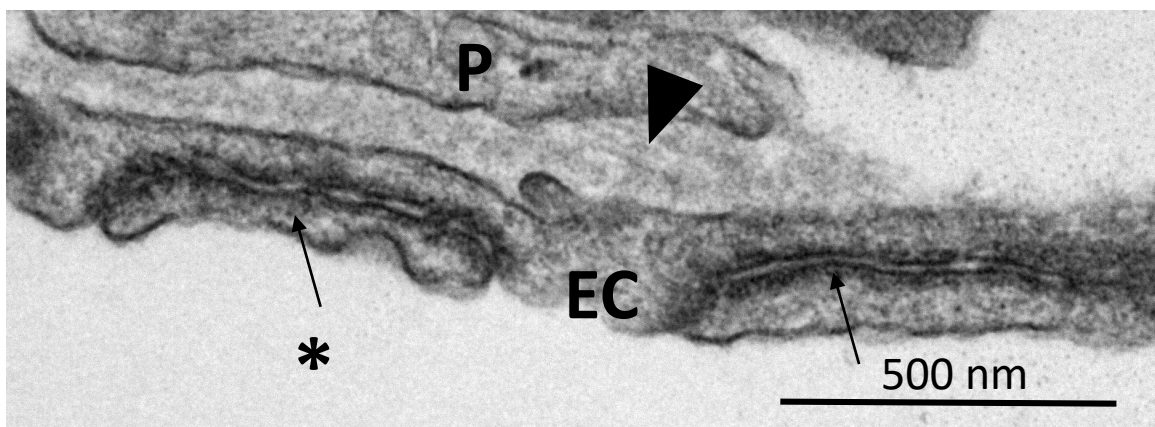


Figure S1 : Les zones non recouvertes de lame basale coïncident avec l'absence de péricytes.

Image représentative de MET d'une coupe de MO contrôle montrant la lame basale discontinue du sinusoid, * : lumière du sinusoid. La flèche noire indiquent la présence d'une fine couche de MEC entre le péricyte (P) et les cellules endothéliales (EC). On note sur cette image la superposition de deux cellules endothéliales adjacentes.

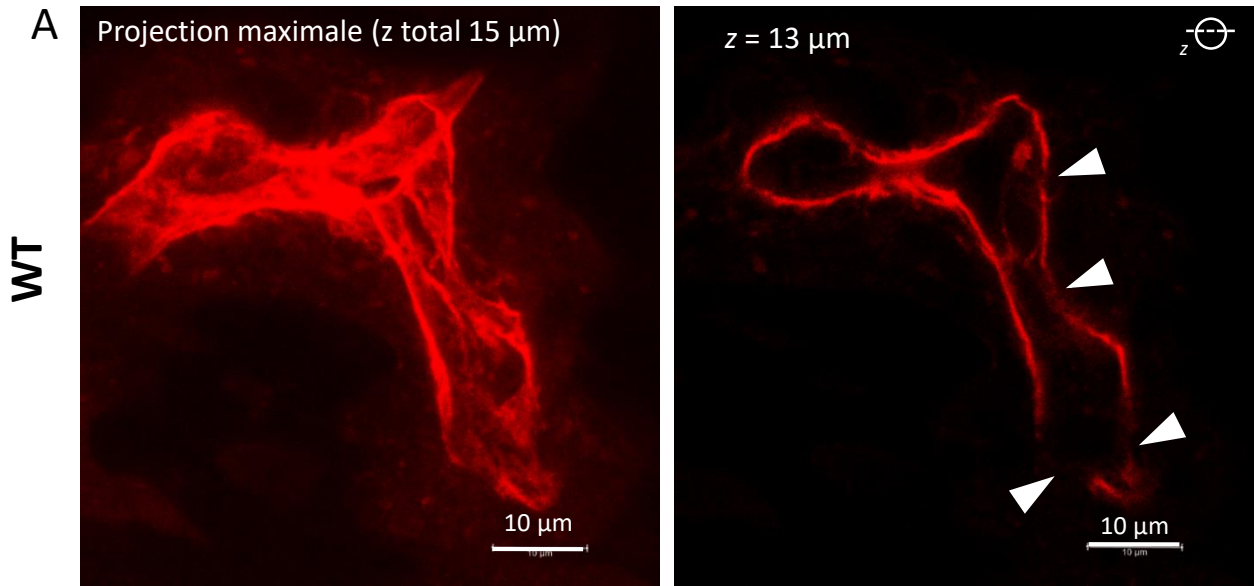
3. Résultats et Discussion

3.1. La lame basale des sinusoides est ponctuée d'ouvertures pré-existantes

Avant d'aborder les mécanismes de passage de la lame basale, nous avons cherché à comprendre la composition et la disposition de ses principales protéines. Des coupes ultrafines de moelles osseuses ont été observées en MET. La figure 1A illustre la lame basale, tapissant la face abluminale des cellules endothéliales du sinusoiide, qui apparait comme une fine couche d'aspect grisé (Figure 1A, têtes de flèches). Celle-ci présente des zones de discontinuité avec des portions moins denses voire inexistante. Nous avons analysé la localisation précise des laminines, du collagène IV, de la fibronectine et du perlécan par immunofluorescence sur des cryosections de moelle osseuse de souris contrôle. En accord avec nos observations ultrastructurales, les quatre protéines ne sont pas réparties de façon uniforme le long du sinusoiide, mais comportent de nombreuses plages vides d'une longueur moyenne de $3,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ($n=110$ sur 4 sinusoides marqués à l'anti-collagène IV) (Figure 1B). La visualisation 3D des sinusoides après immunomarquage de la laminine illustre encore plus clairement ces ouvertures, en comparaison à l'artériole qui est uniformément recouverte de MEC. (Figure 1C). En conclusion, ces résultats indiquent que la lame basale est discontinue et présente des espaces exempts de protéines de matrice. Toutefois, la porosité de la lame basale des sinusoides ne permet pas le passage des extensions mégacaryocytaires ($4,6 \mu\text{m} < \text{épaisseur de la proplaquette}^{128} < 10,6 \mu\text{m}$) suggérant l'existence de mécanismes pour élargir ces ouvertures.

Comment s'explique la porosité de la lame basale ? Nos observations en ME indiquent que les zones pauvres en protéines matricielles sont alignées avec les espaces entre les péricytes adjacents (Figure S1). Elles pourraient donc simplement résulter d'une diminution de synthèse protéique due à l'absence de cellules sécrétrices. Rappelons également que les sinusoides correspondent à une zone de passage de toutes les cellules sanguines lors de l'hématopoïèse. Ainsi, cette discontinuité pourrait également provenir du déplacement de la matrice par les cellules la traversant. De façon intéressante, ces ouvertures font penser aux zones de faible expression de la matrice extracellulaire décrits par S. Nourshargh, qui représentent des sites de passage privilégiés des neutrophiles²⁰⁶. La question se pose maintenant de savoir si les MKs profitent de ces ouvertures, participent à leur création ou les agrandissent par une activité

Sinusoïde



Sinusoïde

Artériole

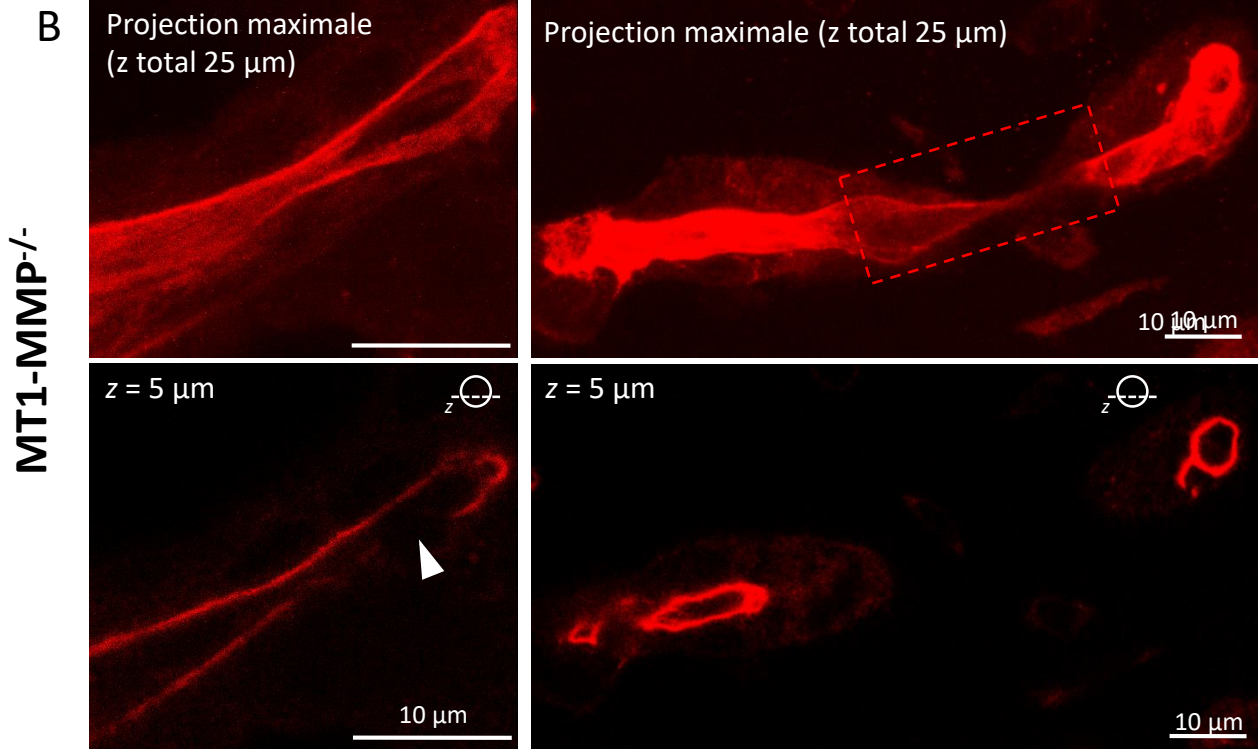


Figure 3 : La lame basale est distribuée normalement dans les moelles des souris MT1-MMP^{-/-}.

Sections longitudinales d'un sinusôide de souris WT (A) et MT1-MMP (B). Ces images ont été obtenues en microscopie confocale sur des coupes épaisses de moelle et correspondent à une projection maximale de 33 à 55 plans focaux (z de 1 μm , profondeur maximale est indiquée par le z total) et à une section optique. Les flèches blanches indiquent des zones des sinusôides non recouvertes par la laminine. Le cadrant rouge correspond à une portion de l'artériole sortant de la hauteur d'acquisition.

enzymatique. Dans la suite de l'étude, nous avons testé l'hypothèse d'une dégradation de la lame basale par les MMPs.

3.2. La MT1-MMP n'est pas essentielle au passage des sinusoides par les MKs

Pour étudier l'implication de cette enzyme dans la transmigration des MKs, nous avons 1) analysé sa localisation subcellulaire et 2) caractérisé les interactions MK-sinusoïde dans les moelles de souris déficientes en MT1-MMP.

3.2.1. La MT1-MMP n'est pas détectée sur la membrane plasmique des mégacaryocytes murins en cours de transmigration. Nous avons d'abord voulu savoir si cette enzyme était localisée dans les podosomes formés par les MKs *in vitro*. Pour cela, nous avons utilisé l'anticorps EP1264Y dont la spécificité a été précédemment validé par S. Weiss sur des cellules carcinomateuses³⁵⁰ (Annexe 2C). Nos résultats indiquent un marquage anti-MT1-MMP faible et ponctué (en vert) dans les MKs formant des podosomes *in vitro* (actine-F, en rouge) (Figure 2A). Une analyse similaire sur des sections de moelle osseuse révèle également un signal fluorescent diffus dans le MK (Figure 2B). Afin de préciser la nature de ce marquage, nous avons réalisée des études d'immunomarquage aux billes d'or en microscopie électronique (IEM). Nos observations mettent en évidence la localisation de la métalloprotéase sur la membrane limitante des α -granules, comme cela a été rapporté pour d'autres MMPs dans les plaquettes sanguines^{365,399} (Figure 2C). Cependant, lorsqu'on s'intéresse à sa localisation dans les MKs en contact direct avec les sinusoides (Figure 2D) ou en cours de transmigration (**non montré**), nous ne détectons pas ou très peu de billes d'or au niveau de leur membrane plasmique ou dans l'interface MK/cellule endothéliale. Ceci est d'ailleurs également le cas pour des neutrophiles en cours de transmigration (Figure 2E). Ainsi, ces résultats laissent entrevoir **une faible contribution de cette enzyme dans le passage des MKs au travers de la lame basale.**

Une limite de cette étude est la difficulté d'obtenir des anticorps commerciaux spécifiques des MMPs permettant d'analyser la présence de la MT1-MMP dans des coupes de moelle⁴⁰⁰. Une alternative à cette approche serait l'hybridation *in situ* sur des cryosections de moelle osseuse qui aurait l'avantage de cartographier les niveaux d'expression des enzymes localisées à la fois dans les MKs et dans les cellules avoisinantes⁴⁰¹. Par ailleurs, étant donné les résultats de transcriptomique démontrant que la MT1-MMP est l'enzyme la plus exprimée dans des MKs humains matures, nos marquages en immunofluorescence/IEM peuvent

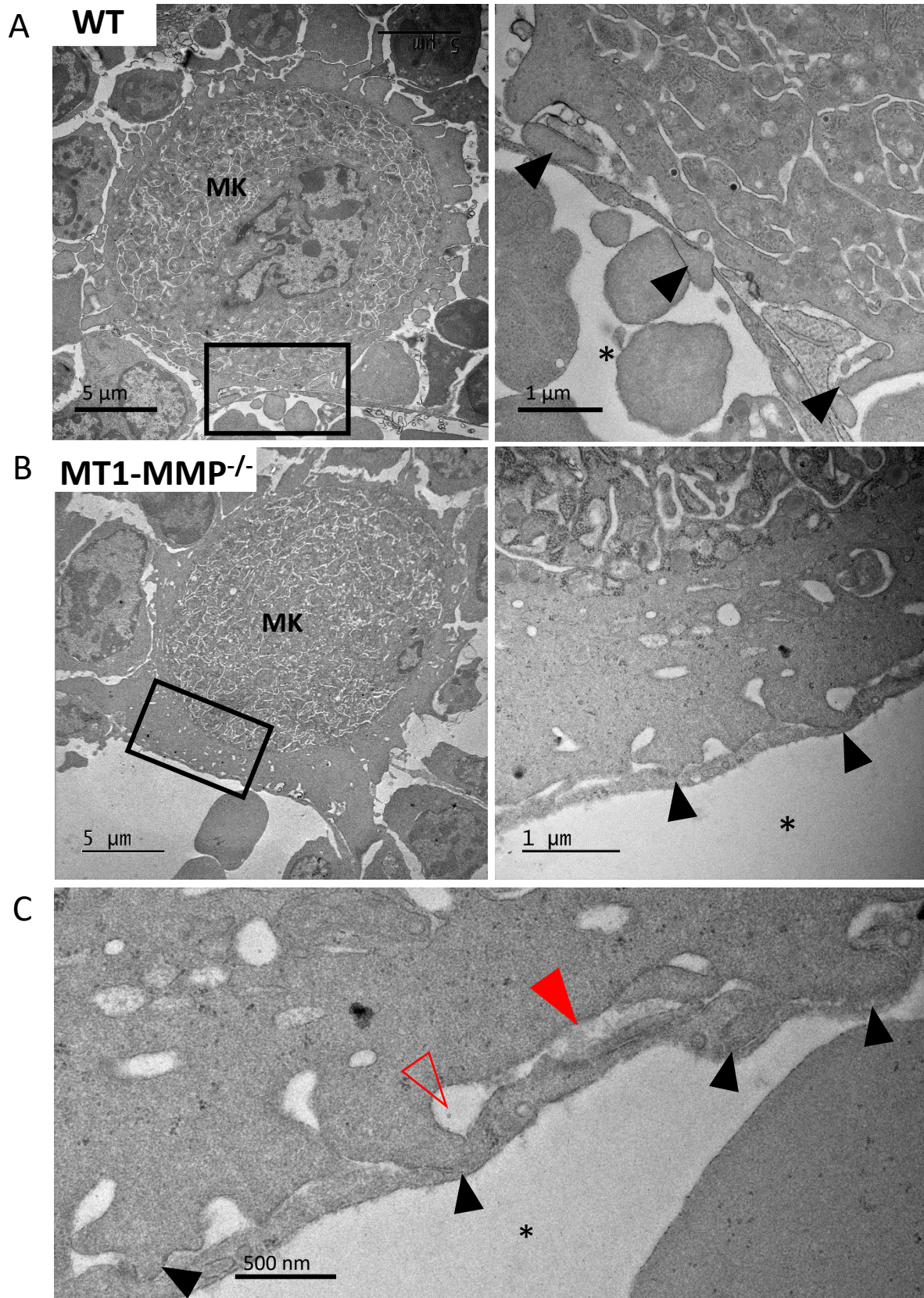


Figure 4 : Les mégacaryocytes MT1-MMP^{-/-} étendent normalement des podosomes invasifs.
 Images représentatives de microscopie électronique à transmission de sections d'os décalcifiés de souriceaux de 10 jours montrant des MKs contrôles (A) ou MT1-MMP^{-/-} (B)(C) formant des podosomes invasifs (têtes de flèche noire) au travers de la lame basale et de l'endothélium du sinusoïde. A gauche, vue globale du MK et à droite, zoom sur l'interaction MK-sinusoïde. (C) La lame basale indiquée par la tête de flèche rouge pleine est traversée par les podosomes (têtes de flèches noires) du MK MT1-MMP^{-/-}. La tête de flèche rouge vide indique une zone dépourvue de lame basale.

sembler étonnamment faibles. De ce fait, il serait important de vérifier l'expression des MMPs des MKs murins, car une différence d'expression entre la souris et l'homme ne peut pas être écartée, comme cela a déjà été constaté pour d'autres enzymes¹³¹.

3.2.2. La lame basale des sinusoides est également discontinue en l'absence de MT1-MMP^{-/-}.

Pour évaluer le rôle de la MT1-MMP dans les interactions MKs-sinusoides *in situ*, nous avons analysé la moelle osseuse de souris déficientes en MT1-MMP (notées MT1-MMP^{-/-}). La létalité de cette lignée ne permet pas le flush de moelle de souris adultes et nous oblige à travailler sur des os entiers de souriceaux. En premier lieu, nous avons voulu savoir s'il y avait un impact de l'absence de l'enzyme sur la composition de la lame basale des sinusoides. Pour cela, nous avons étudié la distribution des laminines sur des coupes de moelles contrôle et MT1-MMP^{-/-}. La figure 3 présente deux images par champs d'observation : la première correspondant à une projection maximale (illustrant l'organisation générale des vaisseaux) et la seconde à une section optique (montrant la distribution protéique de la lame basale). Dans la moelle osseuse des souris MT1-MMP^{-/-}, on constate que la distribution de la laminine est similaire à celle des souris témoins : discontinue au niveau des sinusoides et continue au niveau des artérioles (Figure 3, têtes de flèches), suggérant une moindre implication de cette métalloprotéase dans le remodelage de la MEC autour des sinusoides médullaires. Pour autant, d'autres expériences d'immunofluorescence (ex : marquage du collagène IV, fibronectine) sont encore requises avant de tirer une conclusion définitive sur cette question.

3.2.3. La MT1-MMP n'est pas essentielle au passage de la lame basale.

Nous nous sommes ensuite demandé si la délétion affectait la maturation des MKs et leur capacité à franchir la barrière des sinusoides. L'observation en ME nous a permis de distinguer des MKs MT1-MMP^{-/-} matures, d'aspect normal, contenant un DMS bien développé et une zone périphérique (Figure 4). L'ultrastructure de sinusoides présente également une morphologie normale avec une barrière endothéliale continue et lame basale similaire aux souris contrôles en terme d'épaisseur, de densité et de porosité (flèches rouges, Figure 4C). En outre, nous observons que les MKs MT1-MMP^{-/-} sont capables de former des podosomes invasifs qui traversent la lame basale et déforment l'endothélium de façon similaire aux contrôles (flèches noires, Figure 4). L'ensemble de ces observations suggère que **la MT1-MMP ne joue pas de rôle majeur dans la capacité des MKs à former des podosomes invasifs** qui pénètrent la lame basale des sinusoides. Malheureusement, à ce stade de l'étude, il nous manque une donnée importante concernant la numération plaquettaire de ces souris (difficile à collecter sur des

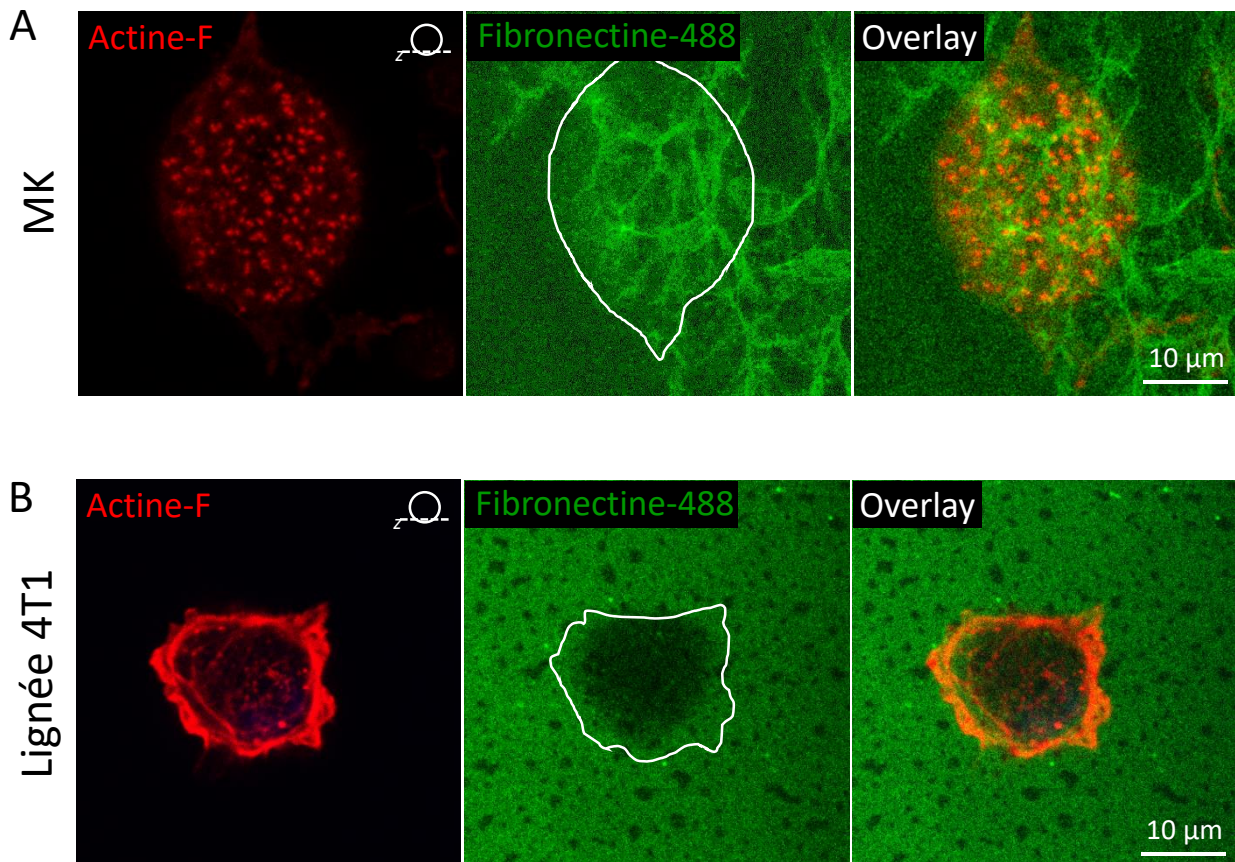


Figure 5 : Caractérisation de l'activité de dégradation de la fibronectine des mégacaryocytes matures, natifs de la moelle osseuse.

Des MKs issus de la moelle de souris contrôles (A) ou des cellules cancéreuses 4T1 (B) ont été déposés *in vitro* sur une matrice de fibronectine fluorescente (en vert) pendant 3h, marqués avec la sonde anti-actine Sir-Actine (en rouge) et observés au microscope confocal. Après 3h, les podosomes sont visibles (en rouge, à gauche) à l'interface de contact avec la fibronectine (en vert, au centre). A droite, la superposition des marquages. L'emplacement du MK reporté en blanc sur l'image du centre ne correspond pas à une zone sombre (signe de la dégradation de la fibronectine) contrairement aux cellules 4T1.

souriceaux pour une équipe n'ayant pas d'expertise en hématologie) et qui nous permettrait de conclure définitivement sur la contribution de MT1-MMP dans la thrombopoïèse.

3.3. Les MMPs des MKs fraîchement isolés de la moelle ne dégradent pas la MEC.

Sachant que d'autres MMPs telles que les MMP-2, MMP-9 pourraient participer à la protéolyse, nous avons utilisé un test global d'analyse de dégradation enzymatique *in vitro*. Pour cela, nous avons utilisé des MKs fraîchement isolés de la moelle osseuse qui ont l'avantage de s'être différenciés dans leur microenvironnement natif. Les MKs ont été déposés sur une matrice de fibronectine conjuguée à un fluorochrome HiLyte Fluor-488 et nous avons recherché la présence de plages sombres correspondant à la dégradation de la fibronectine fluorescente. Aucune zone de dégradation n'a été observée à l'emplacement des MKs (Figure 5A, n=3). Par comparaison, les cellules de la lignée cancéreuse murines 4T1 utilisées comme cellules contrôles forment des plages de dégradation de la fibronectine fluorescente (Figure 5B). Ces résultats sont en accord avec ceux décrits dans l'axe 2 utilisant des MKs déposés sur gélatine (composée essentiellement de collagène fibrillaire) et montrent que **les MKs matures issus de la moelle ne dégradent pas la matrice *in vitro***. Nos résultats contrastent avec ceux publiés par Schachtner *et al.*, 2013 où les MKs cultivés *in vitro* dégradent le fibrinogène. Cette différence pourrait s'expliquer par l'état de différenciation des MKs puisque nous savons que les MKs différenciés *in vitro* ne sont pas pleinement matures (Cf. paragraphe 1.3.1 et Figure 10A de la revue bibliographique). Nos résultats sont également en accord avec une étude collaborative dirigée par Frédérique Gaits-Iacovoni (UMR1297, Toulouse) dans laquelle une forte diminution de la capacité de dégradation de la matrice ainsi que de l'expression de Tsk5 (*Tyrosine kinase substrate five SH3 domain*), protéine centrale de ce processus, est observée au cours de la mégacaryopoïèse. A l'inverse, les progéniteurs hématopoïétiques possèdent de fortes activités sécrétrices de gélatinase associées à une expression élevée de Tsk5. Les auteurs proposent l'hypothèse selon laquelle les progéniteurs hématopoïétiques migrent au cours de la mégacaryopoïèse à travers la moelle osseuse en digérant la matrice extracellulaire via les podosomes, et perdraient ensuite cette capacité de protéolyse lors de la maturation mégacaryocytaire à proximité des sinusoides.

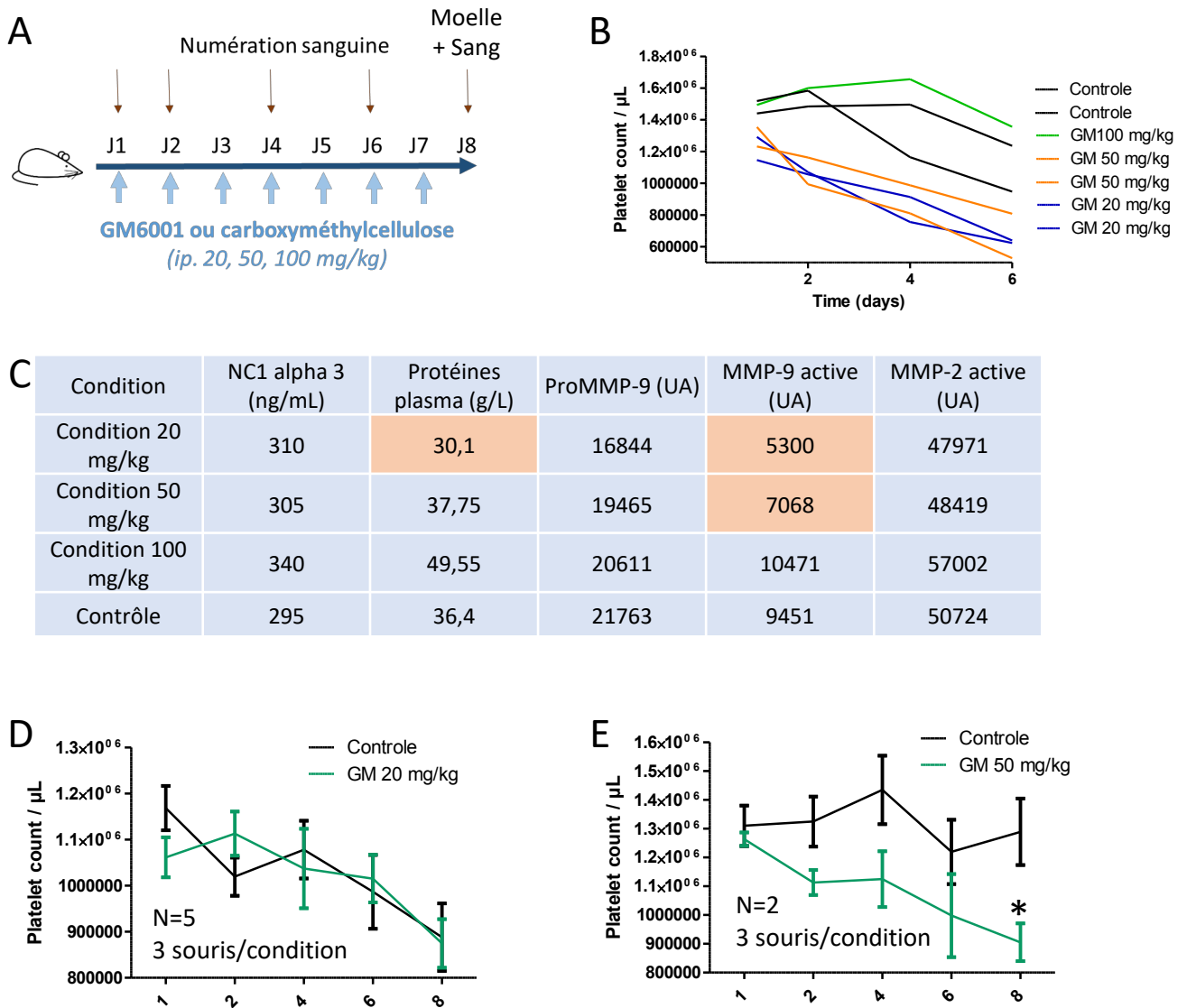


Figure 6 : L'inhibition des MMPs n'affecte pas la libération des plaquettes chez la souris.

(A) Schéma du protocole expérimental, les souris sont traitées tous les jours au GM6001 ou le véhicule. Une numération de suivi est effectuée tous les 2 jours. Au jour 8, la moelle osseuse et le sang sont prélevés. (B) Suivi de la numération plaquettaire sur 6 jours des souris traitées au GM6001 lors de la dose-réponse. (C) Tableau indiquant les dosages de fragments NC1 alpha 3, des protéines totales et des MMPs (en unité arbitraires) réalisés sur les plasmas des souris traitées lors de l'expérience de dose-réponse. (D) Suivi de la numération plaquettaire sur 8 jours de souris traitées au GM6001 (A) 20 mg/kg ou (E) 50 mg/kg, 3 souris par condition et par expérience. En noir apparaissent les courbes des souris traitées avec le véhicule seul, en vert les souris traitées au GM6001.

3.4. L'inhibition des MMPs n'affecte pas la libération des plaquettes chez la souris.

La transmigration des MKs aboutissant à la libération des plaquettes sanguines, nous avons finalement souhaité étudier l'implication des MMPs dans la biogénèse des plaquettes *in vivo*. Pour cela, l'activité des MMPs a été inhibée de façon systémique dans la souris en leur injectant un inhibiteur à spectre large des MMPs, le GM6001 (voir matériel et méthodes). Une étude préliminaire de dose-réponse a d'abord été entreprise pour définir une dose efficace de GM6001. Pour cela, le GM6001 (20, 50 et 100 mg/kg) ou son véhicule, le carboxyméthylcellulose, ont été administrés à deux souris contrôles pendant 7 jours (Figure 6A). La numération plaquettaire, suivie tous les deux jours, indique respectivement une diminution de 47.9% et 47.7% de la numération plaquettaire pour les doses 20 et 50 mg/kg (Figure 6B). Les dosages plasmatiques réalisés à J7 montrent une diminution de la concentration totale de protéines et de la MMP-9 active pour les traitements de GM6001 à 20 et 50 mg/kg, les autres paramètres n'étant pas affectés (c'est-à-dire la tumstatin, le domaine NC1 alpha 3 du produit de dégradation du collagène IV, et la MMP-2 active) (collaboration avec Sylvie Brassart-Pasco, UMR CNRS/URCA 7369, Reims, France) (Figure 6C). Nous avons retenu ces deux doses pour nos tests. A plus grand effectif, à la dose de 20 mg/kg, nous ne notons plus aucune différence significative de la numération plaquettaire du traitement GM6001 en comparaison aux souris témoins (n=15 souris/condition sur 5 expériences) (Figure 6D). A la dose de 50 mg/kg, nous avons seulement constaté une diminution modérée de la numération plaquettaire le dernier jour de l'expérience à J8 (Figure 6E, n=6 souris/condition sur 2 expériences). Néanmoins, ce résultat est à prendre avec précaution puisqu'il repose sur une numération plaquettaire plus élevée chez les souris contrôle, et pas les souris traitées. En résumé, nos résultats indiquent que **l'inhibition *in vivo* des MMPs par un agent pharmacologique n'affecte pas la biogénèse des plaquettes**. Ces données sont à rapprocher de l'étude de Lane *et al.*, qui a montré que l'administration de 5-phenyl-1,10-phenanthroline, un autre inhibiteur à large spectre de MMPs (plus commercialisé), n'a pas d'effet sur la numération plaquettaire en conditions physiologiques⁸⁸. Ce n'est qu'en condition stimulée avec du SDF-1 α que les auteurs montrent un impact de l'inhibiteur sur la numération plaquettaire. Cela soulève la question de savoir si les MMPs favorisent ou accélèrent le passage de la lame basale dans un contexte de besoin rapide en plaquettes.

En conclusion, l'ensemble de ces données indique que, bien que présentes dans les MKs, **les MMPs auraient une contribution minime dans la formation des plaquettes dans des conditions physiologiques.** On ne peut toutefois pas exclure que d'autres enzymes protéolytiques interviennent dans le processus de transmigration. Une étude de Petrey et collaborateurs a révélé que la déficience d'une enzyme protéolytique, la hyaluronidase-2 digérant l'acide hyaluronique, conduit à des thrombopénies⁴⁰². Par ailleurs, cette étude ouvre de nouvelles perspectives de passage de la lame basale telle que la génération de forces pour repousser la matrice^{356,358}.

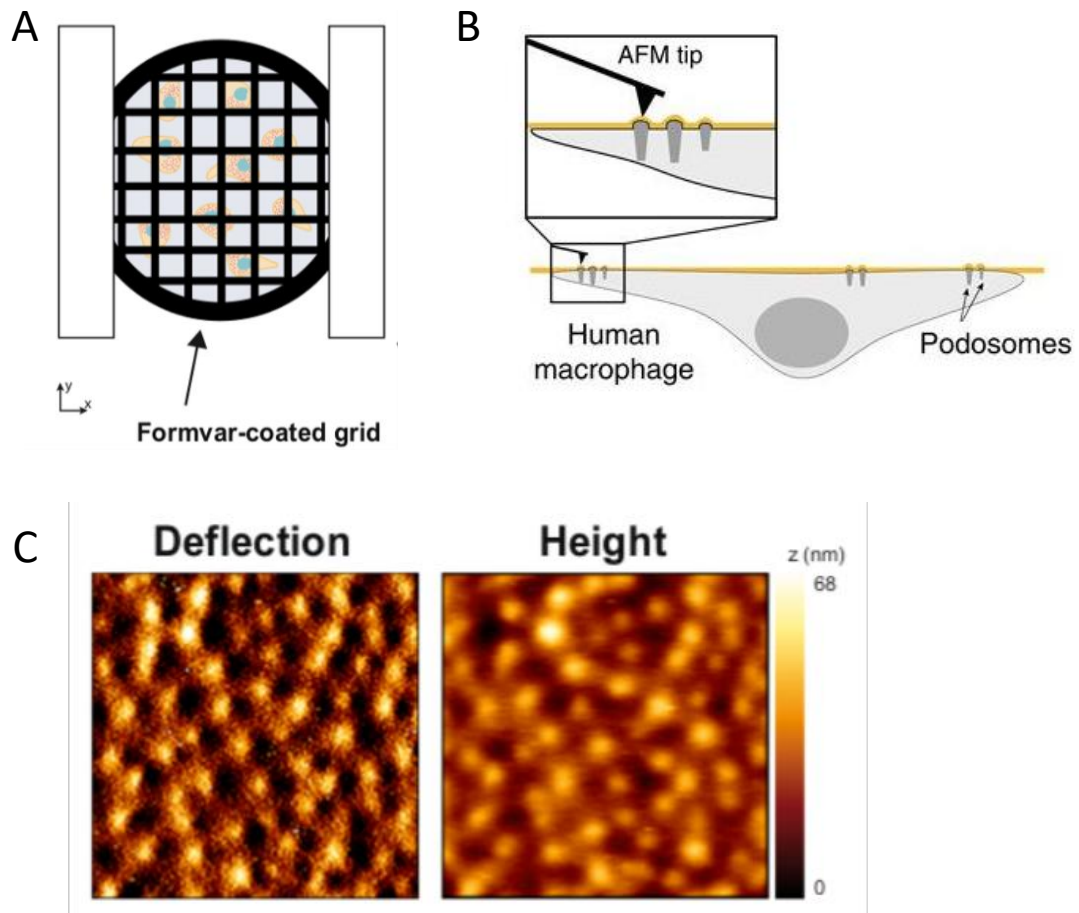


Figure S2. Illustration schématique du protocole de « protrusion force microscopy ».

(A) Les cellules sont déposées sur une grille de microscopie recouverte d'une fine pellicule de Formvar. D'après Bouissou et al., 2018. (B) Mesure des forces de protrusion émis par les podosomes. La grille est placée de façon à orienter les cellules vers le bas et la topologie du film de formvar est imagée à l'aide de l'AFM. Les podosomes engendrent des déformations du formvar. D'après Labernadie et al., 2014. (C) Résultats montrant la déflexion et la hauteur des déformations induites par les podosomes. D'après Bouissou et al., 2018.

3. Discussion et perspectives

3.1. Est-ce que les podosomes des MKs génèrent la force nécessaire pour créer un chemin de migration au travers la lame basale ?

Ayant à l'esprit que les protrusions invasives des MKs sont capables de déformer les noyaux de cellules endothéliales (Cf Axe 2, Figure 4), nous nous demandons maintenant si le passage de la lame basale pourrait résulter d'un déplacement des protéines matricielles par la force. Ce paramètre peut être analysé par une méthode quantitative de microscopie à force atomique (AFM) appelée « protrusion force microscopy » dans laquelle les cellules sont déposées sur une grille de microscopie recouverte d'une fine pellicule flexible de formvar³¹⁶. L'émission des podosomes déforme ce substrat et la topologie qui en résulte peut être mesurée par AFM. Ainsi dans la suite de cette étude, et en collaboration avec R. Poincloux (CNRS, IPBS, Toulouse), nous allons comparer les forces émises par des MKs fraîchement isolés de la moelle présentant des podosomes interconnectés à ceux qui en sont exempts (MKs *in vitro*, Arp2/3^{-/-} ou Wasp⁻ MKs) (Figure S2).

L'énergie nécessaire à produire cette force est également sujette à questions et les mitochondries pourraient y occuper une place centrale comme organelles génératrices d'ATP. D. Sherwood et collaborateurs ont ainsi montré dans le *C. elegans* que l'étape d'invasion de la lame basale impliquait un recrutement des mitochondries au niveau des invadosomes. Celles-ci délivrent l'ATP nécessaire à la polymérisation de l'actine et à l'activité contractile de l'acto-myosine³⁵⁸ (Figure S3A). Ceci est à rapprocher de nos observations montrant des mitochondries à proximité des de la zone périphérique des MKs (Figure S3B). Il serait ainsi intéressant de compléter cette étude en analysant plus précisément ces événements (densité de mitochondries, concentrations locales en ATP) par utilisation de marqueurs mitochondriaux tels que TOMM-20, le mitotracker ou encore des sondes à ATP.

3.2. Les MKs utilisent-ils le mode amiboïde pour franchir la barrière endothéliale ?

Pris dans leur ensemble, les résultats obtenus au cours de cette thèse (Axes 1, 2 et 3) suggèrent que la migration transendothéliale des MKs répond à certains des critères du mode de migration amiboïde employé par d'autres cellules, notamment 1) leur morphologie arrondie, 2) les contorsions cellulaires leur permettant de se faufiler au travers les pores transendothéliaux, 3) leur transmigration se produisant en absence de protéolyse de la MEC

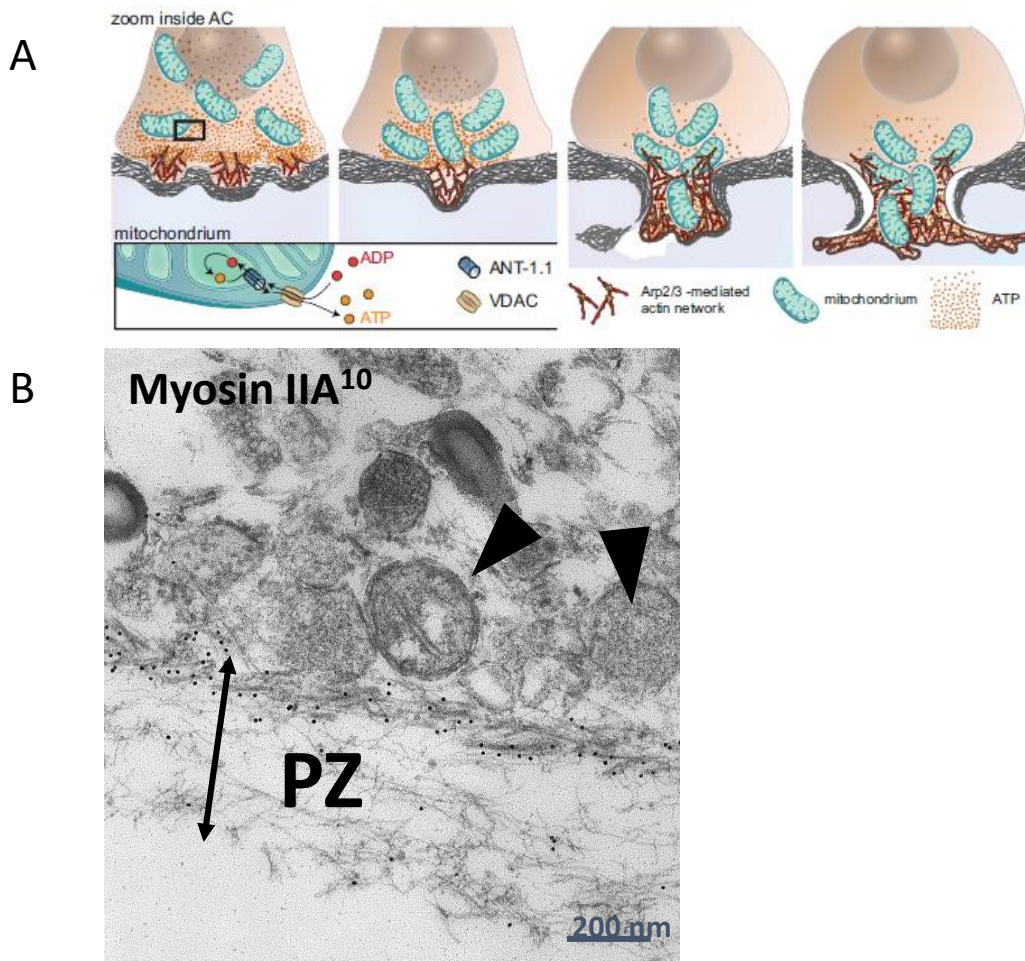


Figure S3. La mitochondrie, organelle au cœur de la génération de force protrusive.

(A) Les mitochondries sont recrutées au niveau de l'invadosome en cours de formation afin de délivrer l'ATP nécessaire à la polymérisation et l'activité contractile de son cytosquelette d'actomyosine. D'après Kelley et al., 2019. (B) Image de MET montrant la présence de mitochondries (tête de flèches) juxtaposées à la zone périphérique. D'après Eckly A., UMR_S1255

	Mesenchymal migration	Amoeboid migration
Morphologie	Cellule allongée avec longues extensions	Cellule arrondie avec protrusions
Stratégie migratoire	Path generating	Path finding
Activité protéolytique de la MEC	Présente	Absente
Interactions avec la matrice	Présence d'attaches des intégrines à la MEC	Absence d'attaches et migration par constriction/propulsion
Signalisation	Rho-ROCK indépendante Src dépendante	Rho-ROCK dépendante Src indépendante

Figure S4. Caractéristiques (trans)migratoires mésenchymateuses et amiboïdes des mégacaryocytes.

Adapté, d'après Yamada et Sixt, 2019 et Hecht et al., 2015 et données personnelles. Les caractéristiques de transmigration des mégacaryocytes sont encadrées en rouge.

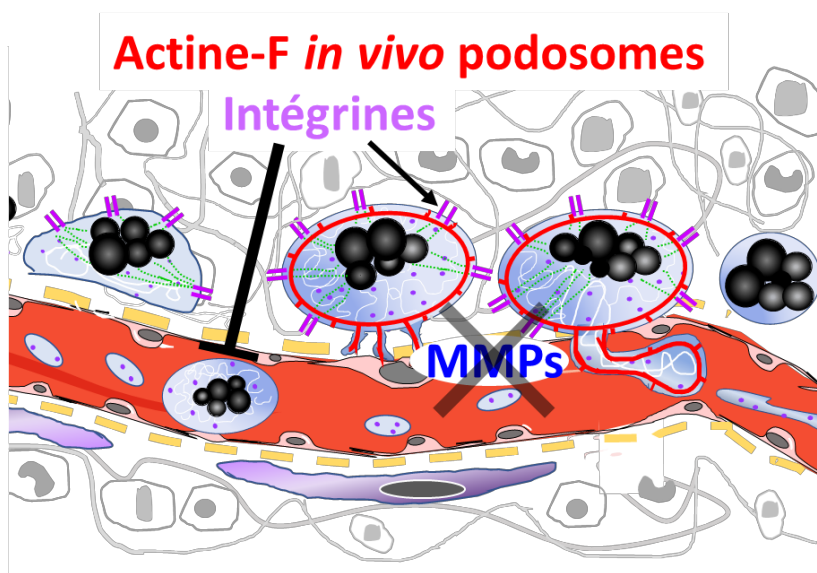
et en absence d'intégrines et 4) leur déplacement lent (Figure S4). Il reste encore à explorer par quels moyens les MKs traversent la lame basale : courtes protrusions qui pénètrent dans les trous naturels de la matrice (« *path finding* ») ou création d'un chemin par la force (« *path generating* ») ? A ce jour, il reste encore beaucoup à découvrir concernant cette étape.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale

Ce travail de thèse, principalement centré sur le passage des MKs au travers des sinusoides de la moelle, fournit un nouvel éclairage sur les mécanismes fondamentaux de ce processus en identifiant l'un de ses acteurs principaux : le podosome. Nos résultats illustrent comment ces petites structures de contact, leur organisation collective et spatiale, sont indispensables pour assurer le bon passage des fragments mégacaryocytaires vers la circulation et permettre ainsi la genèse des plaquettes. L'originalité et la force de ce travail ont été de combiner à la fois cette analyse *in vivo/in situ* à partir des MKs localisés dans leur contexte natif et *in vitro* à partir de MKs différenciés dans la moelle. L'utilisation d'approches complémentaires d'imagerie de haute-résolution, nous a permis d'explorer les mécanismes mis en jeu lors du passage du sinusoides aboutissant à l'intravasation des MKs et de sa régulation.

L'ensemble de ces études nous permet de proposer **le modèle suivant pour le passage des MKs** au travers des sinusoides de la moelle osseuse : 1. les MKs utilisent des podosomes interconnectés pour perforer l'endothélium, 2. les intégrines jouent un rôle dans leur adhérence au microenvironnement de la moelle et dans le maintien structural de leur noyau, limitant ainsi le passage de MKs entiers dans la circulation, et 3. le passage des MKs est indépendant d'une activité de dégradation par les MMPs. La transmigration des MKs est une étape cruciale dans la production des plaquettes. De ce fait, une bonne connaissance des mécanismes est essentielle, tant à **visée cognitive** qu'en termes de **recherche appliquée à visée transfusionnelle**. Ce projet ouvre également de nouvelles perspectives dans le diagnostic et la compréhension des mécanismes physiopathologiques de thrombopénies jusqu'alors inexplicables.



Perspectives

Dans mon travail de thèse, nous avons montré que le cytosquelette d'acto-myosine formait un anneau continu sur toute la bordure des MKs matures, appelé « zone périphérique » et c'est à partir de cette zone que sont issus les podosomes. Il fait également apparaître **la nature collective des podosomes** leur permettant de perforer l'endothélium en de multiples points et ainsi de laisser passer des fragments volumineux des MKs sans endommager l'intégrité vasculaire. Cette organisation interconnectée, *in vivo*, diffère donc notablement de celle décrite jusqu'ici sous forme de podosomes individuels *in vitro*. Cette nouvelle structure, que nous appelons **PodoPZ** (pour **Podosomes of the peripheral zone PZ**), apparaît aujourd'hui comme un acteur essentiel dans l'intravasation des MKs et dans l'interaction du MK avec l'environnement complexe de la moelle osseuse. Nous savons que la formation de la PodoPZ est liée au stade de maturation des MKs et à l'environnement natif en 3D de la moelle osseuse. Il s'agit maintenant de comprendre la signalisation menant à cette mégastructure. La suite de ce travail consistera donc à caractériser **la signalisation spécifiquement mise en œuvre** dans la formation et l'organisation collective des podosomes de MKs. Pour cela, nous développerons deux approches distinctes. La première approche candidate se fera à partir de régulateurs classiques des mégastructures des podosomes. En particulier, nous avons constaté que la composition moléculaire et la morphologie de la PodoPZ étaient comparables à la bande d'actine de la zone de scellement (*sealing zone*) des ostéoclastes. Ainsi, nous nous concentrerons sur les voies de signalisation connues pour jouer un rôle essentiel dans la *sealing zone* c'est-à-dire les kinases Src et les GTPases RhoA. L'équipe de Y. Senis a généré des souris *Src*^{-/-} et elles présentent des défauts plaquettaires majeurs avec d'importants saignements⁴⁰³. Il serait donc particulièrement intéressant de rechercher s'il existe des défauts de transmigration des MKs dans ces souris. Dans la deuxième approche et dans le cadre d'une collaboration avec O. Destaing, nous suivrons un protocole de screening à partir d'une analyse transcriptomique sur des cellules cultivées en 3D pour mimer les contraintes biomécaniques de l'environnement. En particulier, nous utiliserons des cellules DAMI transfectées au LifeAct (lignée de cellules tumorales humaines créée en 1986 à partir d'un patient atteint de leucémie mégacaryocytaire aiguë⁴⁰⁴) qui ont l'avantage d'être facilement cultivables et sensibles aux *phorbol myristate acetate* (PMA), un phorbol ester tumoral induisant leur différenciation en MKs (expression de GPIb et α Ib β 3). Nos résultats

préliminaires indiquent que ces cellules, lorsqu'elles étaient stimulées et cultivées dans du matrigel, sont capables de développer une bande d'actine périphérique similaire à la PodoPZ.

En lien avec le laboratoire d'hématologie et d'hémostase dirigé par A. Dupuis, nous chercherons à élucider **l'importance de la PodoPZ et des défauts de transmigration des MKs dans les thrombopénies sans cause identifiées**. On sait aujourd'hui que des mutations ponctuelles sur des gènes codants pour des protéines caractéristiques des podosomes sont à l'origine de thrombopénies chez l'homme (Cf. Paragraphe 4.3.2). L'étude des gènes responsables de défauts des podosomes devrait donc être incluse dans **le diagnostic des patients présentant des formes congénitales de thrombopathies**. L'accès aux MKs est compliqué chez le patient. Pour contourner ce verrou, nous projetons d'utiliser les plaquettes sanguines qui, à l'image des MKs, sont également capables de générer des podosomes³⁶⁰. Les plaquettes serviraient alors de substituts des MKs permettant d'analyser la machinerie moléculaire des podosomes de MKs de patients. Nous avons déjà standardisé la détection des podosomes sur plaquettes de donneurs sains et planifions actuellement les premiers tests de dépistages sur les plaquettes de patients. Cela ouvrira des perspectives d'exploration fonctionnelle à partir de CD34+ isolés du sang périphérique des patients et, à plus long terme, de définir des banques de données de protéomiques permettant de lier des mutations spécifiques à des thrombopathies. La possibilité de transfecter plus facilement des cellules CD34+ grâce à l'utilisation du système de CRISPR/Cas9, technologie nouvellement développée au laboratoire, nous permettra de valider l'impact de ces mutations et de leur restauration de l'expression génique normale. Outre la compréhension globale du fonctionnement de la PodoPZ, il pourrait être possible d'associer le protéome des podosomes de MKs de patients à des pathologies plaquettaires et ainsi obtenir **un outil de diagnostic médical**.

La transfusion de plaquettes est l'option de choix pour les patients présentant non seulement une thrombopénie constitutive mais également pour les personnes de plus en plus nombreuses avec thrombopénie secondaire, suite à un traitement anticancéreux par exemple. La **production de concentrés de plaquettes de culture destinés à la transfusion** pourrait représenter une alternative industrielle pour faire face aux besoins en plaquettes sans cesse croissants et, aux contraintes de sécurité sanitaire de plus en plus strictes. La production de plaquettes de culture est possible à partir de cellules souches pluripotentes (iPS) ou de lignées qui en dérivent, ou des progéniteurs hématopoïétiques (CD34). Notre

laboratoire utilise des cellules CD34⁺, qui cultivées en présence de facteurs appropriés, suivent un développement en 2 phases : une première de prolifération et d'engagement suivie d'une phase de maturation aboutissant à la formation de MKs de grandes tailles. Ces MKs *in vitro* diffèrent des MKs *in vivo* par leur degré de maturité moins élevé. De ce fait, les rendements de ce processus de différenciation *in vitro* restent encore bien trop faibles pour envisager dès aujourd'hui une application industrielle réaliste. Une bonne compréhension de la genèse des plaquettes dans l'organisme reste donc encore un préalable nécessaire. Ce travail de thèse qui souligne l'importance de la zone riche en actomyosine qui caractérise les MKs les plus matures *in vivo*, ouvre la possibilité de **développer des critères de contrôle de la qualité des MKs pour une amélioration de la production de plaquettes de culture.**

Annexes

Annexe 3 : *Use of electron microscopy to study megakaryocytes*, Scandola C., Erhardt M., Rinckel J-Y., Proamer F., Gachet C., Eckly A., Platelets, 2020

Annexe 4 : *In Situ Exploration of Murine Megakaryopoiesis using Transmission Electron Microscopy*, Scandola C., Lanza F., Gachet C., Eckly A., Journal of Visualized Experiments, 2021.

Annexe 5 : *Heparan sulfates are critical regulators of the inhibitory megakaryocyte-platelet receptor G6b-B*, Vögtle T., Sharma S., Mori J., Nagy Z., Semeniak D., Scandola C., Geer M.J., Smith C.W., Lane J., Pollack S., Lassila R., Jouppila A., Barr A.J., Ogg D.J., Howard T.D., McMiken H.J., Warwicker J., Geh C., Rowlinson R., Abbott W.M., Eckly A., Schulze H., Wright GJ., Mazharian A., Fütterer K., Rajesh S., Douglas MR., Senis Y.A., eLIFE, 2019.



Use of electron microscopy to study megakaryocytes

Cyril Scandola, Mathieu Erhardt, Jean-Yves Rinckel, Fabienne Proamer, Christian Gachet & Anita Eckly

To cite this article: Cyril Scandola, Mathieu Erhardt, Jean-Yves Rinckel, Fabienne Proamer, Christian Gachet & Anita Eckly (2020): Use of electron microscopy to study megakaryocytes, Platelets, DOI: [10.1080/09537104.2019.1708885](https://doi.org/10.1080/09537104.2019.1708885)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/09537104.2019.1708885>



Published online: 05 Jan 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)




View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Use of electron microscopy to study megakaryocytes

Cyril Scandola¹, Mathieu Erhardt², Jean-Yves Rinckel¹, Fabienne Proamer¹, Christian Gachet¹, & Anita Eckly ¹

¹INSERM, EFS Grand Est, BPPS UMR-S 1255, FMTS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France and ²IBMP-UPR2357, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

Abstract

Electron microscopy (EM) has a long history in megakaryocyte (MK) cellular biology. This chapter shows how the electron microscope, since its first appearance almost 90 years ago, has occupied center stage in the studies of MK morphology and function. It describes some of the more productive EM techniques that have shaped our understanding of the physiology of thrombopoiesis. These include the standard transmission and scanning EM techniques as well as the new imaging methods, correlative microscopy and volume EM which provide information on the 3D organization of MKs on different scales: single organelles, whole cells and tissues. For each technique, we list the advantages and limitations, the resolution that can be achieved, the technical difficulties and the applications in MK biology.

Keywords

Bone marrow, correlative light electron microscopy, electron microscopy, megakaryocytes

History

Received 26 September 2019
Revised 15 November 2019
Accepted 11 December 2019
Published online xx xxx xxxx

Historical Background

Due to its large size, the MK was the first hematopoietic cell to be described with considerable accuracy. Evidence for the megakaryocytic origin of platelets came from the study of Wright in 1906, who examined histological sections using rudimentary microscopic equipment and noted that MKs and platelets had apparently identical cytoplasm [1] (Figure 1). Fifty years later, using the newly developed transmission electron microscopy (TEM) techniques [2,3], Yamada gained access to the internal structure of MKs. He described the demarcation membrane system (DMS) as a network of membrane vesicles and tubules which were thought to delimit “pre-formed platelets”, the latter being released upon cytoplasmic fragmentation [4–6]. However, this concept requires that the “pre-formed platelets” be surrounded by microtubule coils, which has never been demonstrated. In 1976, the first scanning electron microscopy (SEM) micrographs revealed MKs extruding cytoplasmic extensions into bone marrow sinusoids that have originally been named “proplatelets” [7,8]. Cytoplasmic prolongations had already been observed in 1956 using phase contrast cinematography by Thiery and Bessis, who found that MKs from bone marrow explants could extend elongated thin and branched projections [9]. In 1982, using ruthenium red as an electron dense extracellular marker, Radley and Haller discovered that when MKs were exposed to microtubule depolymerizing agents, the proplatelets retracted and the DMS reappeared in the cell body [10]. They thus postulated that the DMS, rather than delineating individual platelets, is a membrane supply reserve for proplatelets. The first insights into the cytoskeletal mechanics of platelet formation date from the TEM observations of Tablin et al., who showed that *in vitro* proplatelet elongation is dependent on microtubules [11].

Since then, with the discovery and cloning of TPO in 1994, many studies have documented the formation of proplatelets in MK cultures [12–18]. In 1999, while studying replicas of the MK cytoskeleton, Hartwig’s group reported that platelets bud off from the ends of proplatelet extensions [19], leading to the “proplatelet model” becoming accepted as the prevalent mechanism of platelet release from MKs. More recently, 3D imaging of MKs with electron tomography and large volume Focused Ion Beam (FIB)-SEM showed that the DMS derives from the cell surface as well as from intracellular membrane sources (Golgi and endoplasmic reticulum) [20]. Last year, Poole and colleagues combined intravital fluorescence imaging with TEM to demonstrate that MKs enter the sinusoidal space as large protrusions (from 4–10 µm) rather than extruding fine proplatelet extensions (<3 µm) [21], challenging the current view of how platelets are generated. Large protrusions are not formed from cultured MKs, leading the authors to suggest that this stage is bypassed *in vitro* and that some elements of the bone marrow environment are key for their generation.

To conclude this historical revue, among many old but still relevant manuscripts, we would like to recommend the review by Behnke and Forer published in 1998 “From megakaryocytes to platelets; platelet morphogenesis takes place in the bloodstream” [22] and the “Atlas book of Blood cells” by Zucker-Franklin [23] for the high quality and reliable description of the EM images.

Megakaryocytes at High Magnification: transmission Electron Microscopy Methods

Conventional TEM

Description

Conventional TEM is the method most commonly used to explore the ultrastructure of MKs. The principle of this approach is that electrons pass through a thin sample. The transmitted electrons carry information about the sample, which is collected by a camera to create a projection image (Figure 2a).

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/iplt.

Correspondence: Anita Eckly, Etablissement Français du Sang-Grand Est, UMR-S1255 INSERM-Université de Strasbourg, 10, rue Spielmann, B.P. N°36, Strasbourg Cedex 67065, France. E-mail: anita.michel@efs.sante.fr

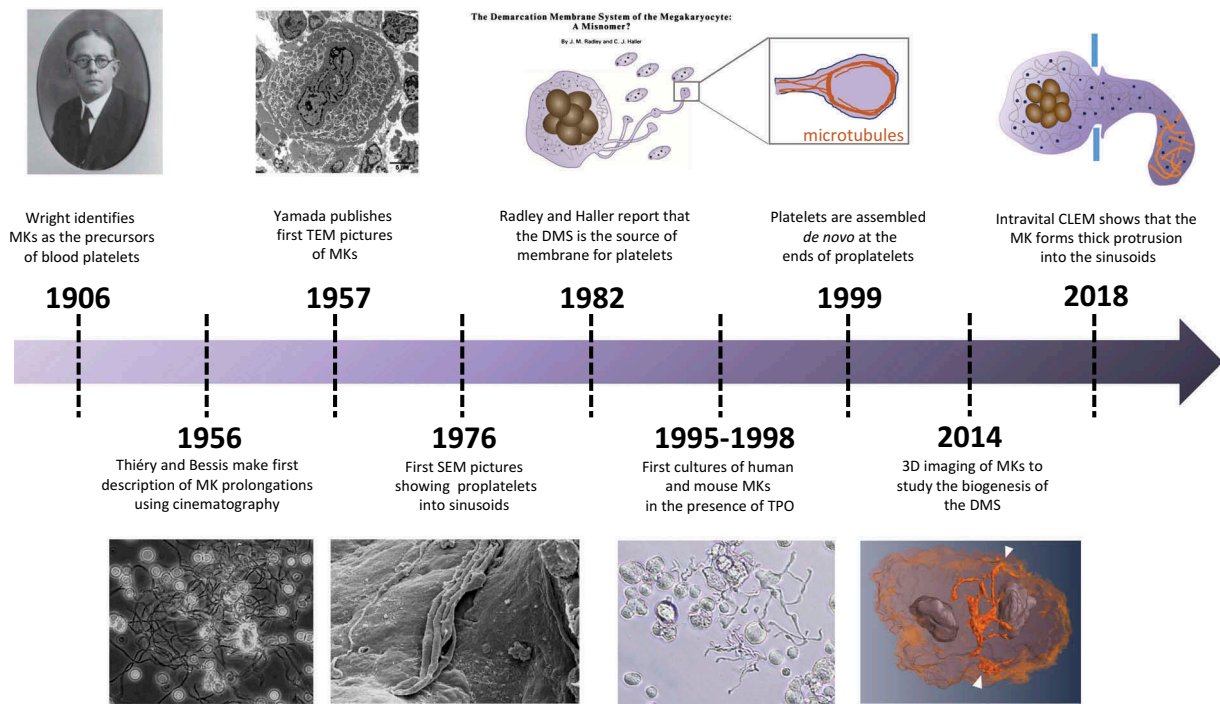


Figure 1. **Key events in the EM history of MK biology.** This figure highlights the important discoveries in MK biology made using EM.

TEM Sample Preparation

MKs (from bone marrow (BM) or cultures) are fixed in glutaraldehyde, post-fixed in osmium, dehydrated with alcohol and embedded in a plastic resin. The samples are sectioned (80–100 nm), counterstained with heavy metals and examined under a transmission electron microscope at 80–120 kV [24]. An alternative method to chemical fixation is cryofixation. Taking into consideration the size of the sample, electron microscopists have a wide range of cryo-techniques at their disposal. Thin sample, such as platelets, can be vitrified in a thin layer of ice on a TEM grid by plunge freezing. Vitrification of larger cells up to $\sim 200 \mu\text{m}$ thickness such as MKs can be achieved by high-pressure freezing (HPF) by combining jets of liquid nitrogen simultaneously with very high pressures to prevent the formation of ice crystals. Significant advantages of cryoimmobilisation over chemical fixation is the preservation of the molecular structures in their native environment and the possibility to catch a dynamic cellular process [25].

TEM to Study the Developmental Stages of MKs

In BM sections, MKs may be classified in three stages: (I) the earliest recognizable MKs of 10–15 μm diameter with a large nucleus, (II) cells of 15–30 μm diameter containing platelet-specific granules and (III) mature MKs, 30–50 μm in diameter, having a well-developed DMS with clearly defined cytoplasmic territories and a peripheral zone (PZ) devoid of organelles. A supplemental stage may be added to describe an MK which has released all its cytoplasm into the circulation and consists of a denuded MK nucleus. Additional morphological characteristics, such as the interactions of mature MKs with sinusoids, apoptotic MKs or emperipolesis (the presence of hematopoietic cells within the MK cytoplasm) can also be analyzed.

Remarkably, the ultrastructure of *in situ* and *in vitro* mature MKs display some clear differences (Figure 2aii-iii). Firstly, *in situ* MKs contain α - and δ -granules having a similar

appearance as in platelets. In contrast, cultured MKs contain numerous multivesicular bodies (MVBs) displaying internal vesicles and an electron dense matrix [26,27]. Another important distinction is the marginal zone of the cells. *In situ*, mature MKs are bordered by a thick peripheral zone (PZ) rich in actin filaments which forms a continuous network surrounding the entire cell. On the contrary, this actin-rich zone is absent from cultured MKs. Instead, the microtubules are located in the periphery of maturing MKs and fill the cortex of the proplatelets [28,29]. The exact role of the actin-rich PZ *in situ* remains poorly understood. It has been proposed that it forms a barrier preventing the premature extension of proplatelets until the MK is correctly located to release platelets [11,30]. More recently, we observed that short projections originate from this PZ and play a crucial role in the early phases of MK transendothelial crossing [31].

Immunoelectron Microscopy

2.2.1. Description. IEM is an essential tool to examine the subcellular localization of molecules within MKs at nanometer resolution. This is achieved by specific antibodies and protein-A conjugated to gold particles, the latter having sufficient electron density to make them visible in TEM. In our opinion, the most reliable and sensitive immunolocalization technique for MK studies is cryosectioning according to Tokuyasu [32,33] (Figure 2b).

Tokuyasu Sample Preparation

MKs are fixed in paraformaldehyde, infiltrated with sucrose, frozen in liquid nitrogen and cryosectioned. It should be mentioned here that obtaining good quality cryosections (without knife marks, shrinkage or stretching) represents a challenge, especially when cutting BM samples. The cryosections are immunolabeled, stained with uranyl acid and methylcellulose and examined by TEM [20,33].

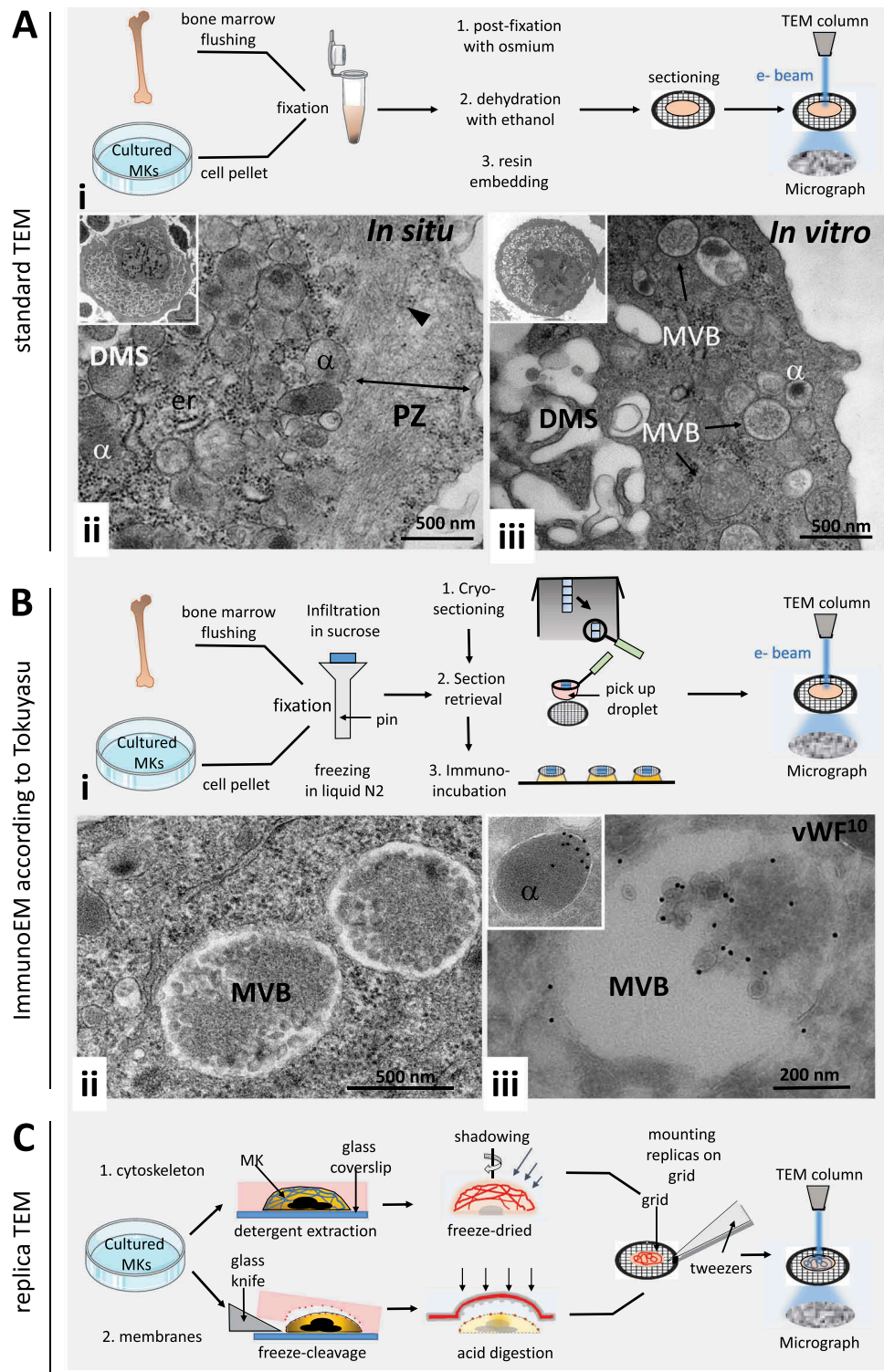


Figure 2. **Imaging MKs using TEM.** (a) **Standard TEM.** (i) Schematic representation of TEM sample preparation. MKs are fixed, post-fixed with heavy metals, dehydrated with ethanol and embedded in a plastic resin. Samples are sectioned with an ultramicrotome and mounted on EM grids. After contrasting with heavy metals, the cell sections can be examined under a transmission electron microscope (TEM). (ii) Detail of the peripheral zone (PZ) of a mature bone marrow (BM) MK (inset) showing the presence of actin filaments (arrowhead). (iii) Cultured MKs have no characteristic PZ. α : α -granule; er, endoplasmic reticulum. (b) **ImmunoEM.** (i) Schematic representation of the preparation methods. Frozen blocks of fixed, cryoprotected MKs are cut using a dry knife which has been cooled. The cryosections are mounted on coated grids, immunolabeled, contrasted and examined under a TEM. (ii) vWF immunogold staining of mature BM MKs. The labeling is mostly associated with α -granules. (c) **Replica methods.** Upper panel: for the MK cytoskeleton. MKs in culture are fixed, allowed to adhere to glass coverslips and exposed to detergents. The cytoskeletal elements are quick-frozen, freeze-etched and rotary-replicated with platinum and carbon in a freeze-fracture apparatus. The replicas are placed on EM grids and viewed under a TEM. Lower panel: for freeze-cleaved MK membranes. MKs are high-pressure frozen, freeze-fractured to cut across the cytoplasm and freeze-etched to sublimate ice in the cytosol and the lumen of organelles. The cellular structures highlighted by these procedures are coated with a thin layer of platinum and carbon deposited by vacuum evaporation and this platinum-carbon layer, or replica, is examined by TEM.

IEM to Explore Granule Biogenesis

Using IEM, it has been demonstrated that multivesicular bodies participate in the formation of α - and δ - granules (Figure 2bii-iii). Thus, immunogold localization of vWF, P-selectin, and CD63 has been shown in the MVBs of cultured MKs [26,27]. Another example concerns the endocytosis of plasma proteins. α -granules acquire their protein content via two distinct, biosynthetic and endocytic routes [34,35]. IEM studies have revealed the presence of fibrinogen, albumin and immunoglobulins in MK granules following injection in the circulation, indicating that these proteins are taken up by fluid phase endocytosis [35,36]. Furthermore, IEM showed that some biosynthetic and endocytosed proteins (vWF and fibrinogen) have a polarized intragranular distribution, as also observed in platelets [37,38].

Replica Methods

A totally different approach is the study of surface replicas. Two kind of replica methods have been documented on MKs: images of cytoskeletal elements and of freeze-cleaved membranes (Figure 2c).

Imaging the MK Cytoskeleton

Hartwig's group used this approach to investigate the organization of the microtubules at specific stages of proplatelet morphogenesis [19,39]. They demonstrated that the ends of proplatelet extensions contain peripheral bundles of microtubules similarly organized as in blood-derived platelets, suggesting that mature platelets are released from the ends of proplatelets. In practice, cultured MKs are allowed to adhere to the surface of coverslips and incubated with a buffer containing glutaraldehyde, Triton X-100 and cytoskeleton-stabilizing drugs. The coverslips are frozen, freeze-dried and coated with tantalum-tungsten and carbon. The replicas are then floated, picked up on formvar-carbon-coated grids and examined under the microscope.

Visualization of Freeze-cleaved Membranes

This method is described in detail by Zucker-Franklin [5] and Tavassoli [40]. Briefly, fixed cultured MKs are cryoprotected with glycerol and quick-frozen in liquid nitrogen. Membrane cleavage is performed under vacuum at -100°C . The surfaces are coated with platinum-carbon and the proteinaceous material adhering to the platinum-carbon replica is removed by acid digestion. Where the fracture line exposes the plasma membrane of MKs, the invaginations are found to be continuous with the DMS, confirming that the latter originates from plasma membrane invaginations [5]. On tangential fractures, they appear as tubules lying side-by-side. Hence Shaklai and Tavassoli [41] proposed a 3D model in which parallel aligned DMS tubules fuse together and change into flat sheets of membranes enclosing the cytoplasmic territories of the MK [40,41]. Although we know today that the DMS does not delineate pre-formed platelets, the description of its tubular arrangement is interesting. Accordingly, it has been shown that DMS biogenesis is strongly dependent on F-BAR proteins, such as CIP4 and PACSIN-2, which are known to regulate tubular membrane invaginations [42,43].

Topology of Megakaryocytes: scanning Electron Microscopy Studies

Description

The literature contains many studies of proplatelets based on SEM [7,44–49]. In this approach, the surface of a sample is scanned with focused electrons and secondary electrons are collected to generate surface images (Figure 3a).

SEM Sample Preparation

Samples are fixed and dehydrated as in TEM, but instead of embedding the sample in a plastic resin, it is mounted on an SEM stub, covered with a conductive coating of a fine metal by evaporation and no further processing is necessary. Images are obtained at low voltage ($<5\text{ kV}$) [22].

Comparison of Proplatelets in Bone Marrow and in Vitro Cultures

On longitudinal BM sections (Figure 3b), the central sinus is clearly visible with the openings of the sinusoids into the vein. SEM observation demonstrates that the endothelium forms a continuous non fenestrated barrier. Mature MKs appear as large round cells and MK processes of variable size, length and diameter are visible in the lumen of the sinusoids. Notably, they are mostly linear, some processes being very large and others constricted along their length [22]. In contrast, *in vitro* MK extend numerous interlaced proplatelets. They present a regular thin shaft terminated by a bud (Figure 3c). SEM observations of detergent-extracted cultured MKs allow visualization of the microtubule coils in the proplatelet tips (Figure 3civ). However, while SEM imaging yields a 2D view of the outer surface of a cell, a major limitation is that it prevents visualization of the intracellular structures.

3D EM Imaging of Megakaryocytes

Using TEM, interpretation of the 3D organization of complex structures from 2D sections is difficult and most often leads to their "simplification". Therefore, it is essential to gain access to the ultrastructural information contained in thick sections or - ideally- in the whole volume of a MK. Volume imaging can be performed using transmission or scanning electron microscopy. Depending on the desired sample size and resolution, the spectrum ranges from electron tomography through FIB-SEM and serial block face SEM, to array tomography (Figure 4). To date, only a few groups have used volume EM imaging to study MK biology, mostly to investigate DMS biogenesis and MK crossing through BM sinusoids.

Manual Serial Sectioning and ATUM

Manual Serial Sectioning

Manual serial sections are cut by hand using an ultramicrotome. Although this method can be employed in any EM facility as it does not require special equipment, its success depends on the skill of the operator, who must painstakingly collect and image each ultrathin section. Hence it has not been used very often, except in the study of Tavassoli and Aoki, who investigated the transmural passage of MKs into sinusoids and were able to capture a rare event, namely the migration of an entire MK through the cytoplasm of a single endothelial cell [50].

Array Tomography and ATUM

A recent improvement in serial sectioning is array tomography, whereby ribbons of serial ultrathin sections are cut and collected on a sample holder [51,52]. This automatic tape-collecting ultramicrotome (ATUM) technique allows one to accurately cut thousands of sections. The sections are imaged by SEM owing to the non-transparency of the tape to electrons. Similarly, in the new complementary approach known as correlative array tomography (CAT), arrays of serial ultrathin sections are collected on glass

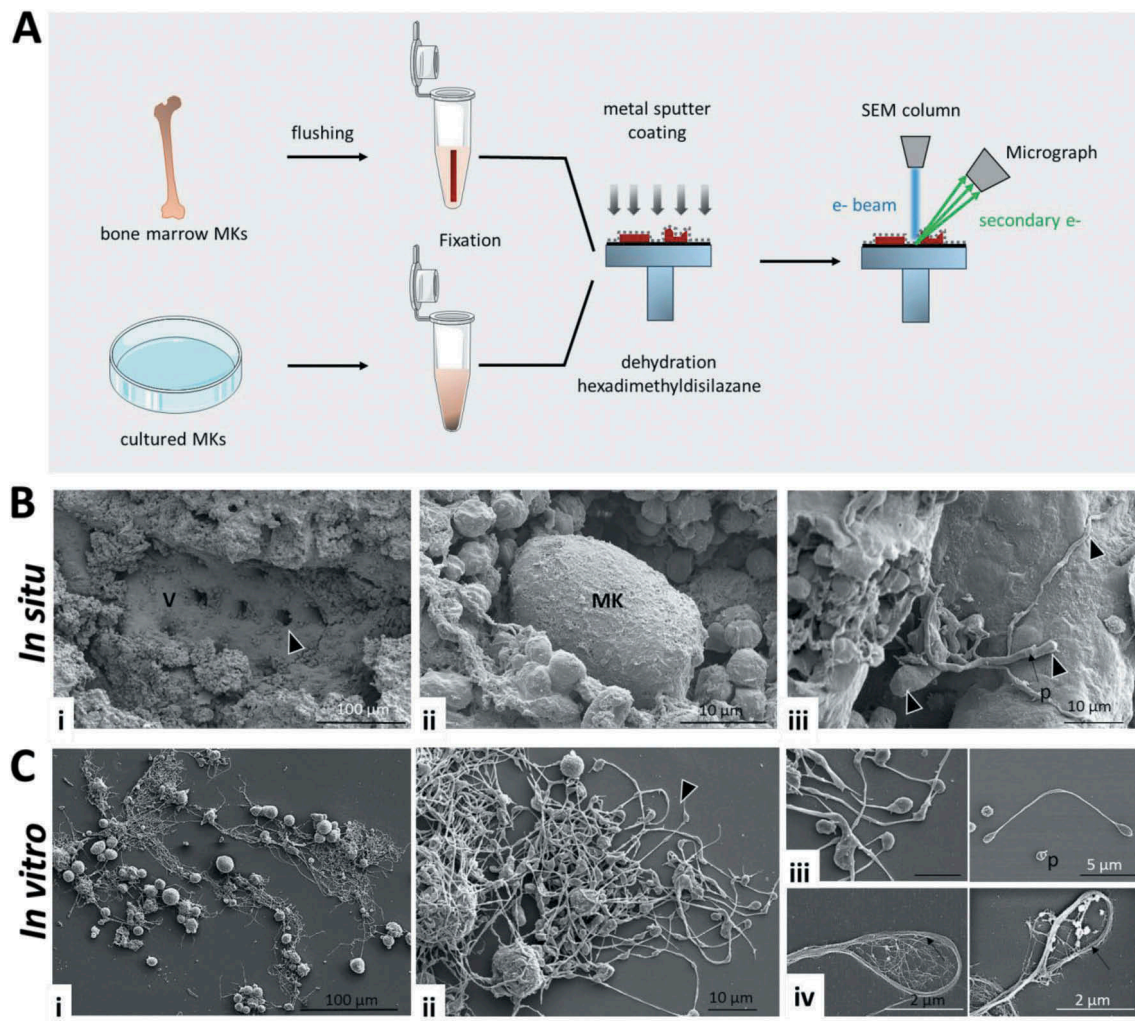


Figure 3. **Imaging MKs using SEM.** (a) Schematic representation of SEM sample preparation. MKs in culture or flushed BM samples are fixed, allowed to adhere to poly-L-lysine-coated coverslips and dehydrated in ethanol. After further processing with hexadimethyldisilazane and sputter-coating with gold, the samples are viewed under a scanning electron microscope (SEM). (b) Scanning electron micrographs of mouse bone marrow. (i) The luminal side of the central vein (V) is illustrated, showing the openings (arrowhead) into the vein. (ii) Mature MKs in the stromal compartment display a round shape and are 30–50 μm in diameter. (iii) The variations in thickness and length of MK processes are clearly visible in the lumen of sinusoids. Note the continuous, non-fenestrated aspect of endothelial cells. (c) Scanning electron micrographs of cultured MKs differentiated from Lin⁻ BM progenitor cells. (i) Representative image of proplatelet development on day 4 of MK culture. (ii) MK extending multiples thin and highly branched proplatelets. (iii) Constrictions delineating platelet-sized areas are observed along the proplatelets and platelet-sized doublets and isolated platelets are present in the culture. (iv) Microtubule coils within the tips of proplatelets, similar to those in circulating platelets, are visible in detergent-extracted MKs.

slides, fluorescently labeled (with antibodies or stains) and imaged by confocal microscopy to visualize the 3D distribution of antigens. ATUM and CAT have not yet been used to study megakaryocytes.

Serial Block Face SEM (SBEM)

Description

This method employs a scanning electron microscope to obtain pictures of samples which are serially sectioned using an integrated microtome [53]. It enables large-field imaging (~0.5 mm³) at high resolution, providing information on the 3D distribution of MKs and their shape, volume and structure in normal or genetically modified tissues. Although the z-resolution is limited by the thickness of the slices (20 to 50 nm), this is nevertheless sufficient to visualize the thinnest proplatelets.

SBEM Sample Preparation

Sample preparation does not differ significantly from conventional TEM processing. As the back-scattered SEM mode is employed, high contrast with heavy metal stains is required. In practice, the epon block is mounted on a SEM stub, coated with platinum/palladium and placed in the microscope. After each cut, the block face is imaged before the next section is shaved off. After contrast reversal, the images resemble classical TEM micrographs with voxel sizes of 20 × 20 × 25 nm.

SBEM to Produce 3D Images of Bone Marrow

Use of this technique has not yet been documented in the MK field. Our laboratory has applied it to mouse BM and could confirm the parasinusoidal localization of MKs, irrespective of their maturation stage (Figure 5), as previously reported [47,54].

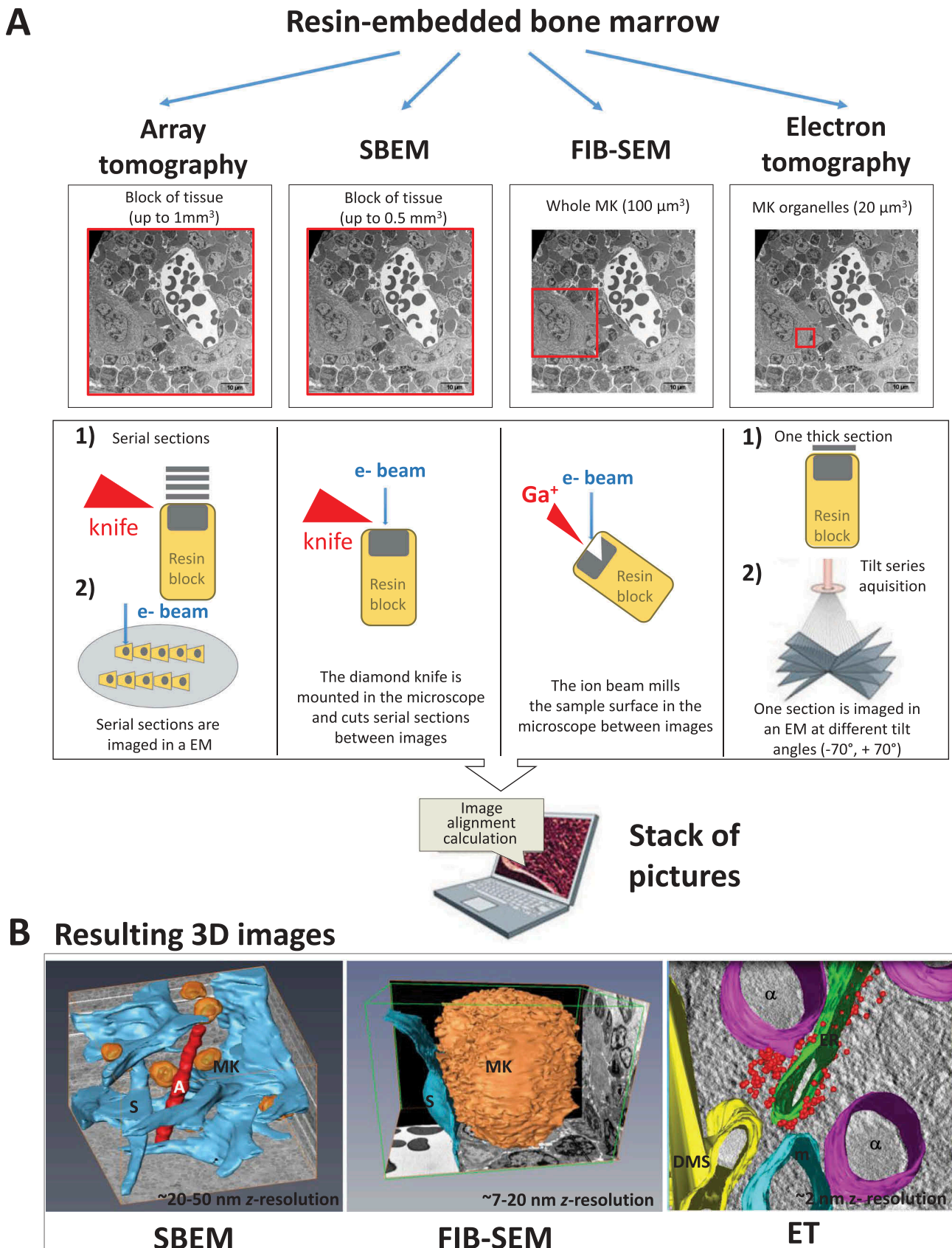


Figure 4. **Comparison of volume EM techniques used to analyze the structure of MKs from resin-embedded bone marrow.** (a) Schema showing the different approaches to 3D electron microscopy image acquisition. For array-tomography, serial sections are cut with a diamond knife and collected on an adhesive tape mounted on an automated conveyor belt (ATUM). One mm³ of a region of interest can be analyzed. Using SBEM, serial sectioning is performed with a diamond knife mounted inside the microscope chamber. This is appropriate for high-resolution imaging of large volumes of tissue (~0.5 mm³). FIB-SEM uses an ion beam to mill the tissue inside the microscope chamber, leading to 3D information of whole MKs. Electron tomography (ET) is ideal to study cell organelles but is limited to thick sections (~500 nm) and therefore not appropriate for whole cells or tissues. In all cases, the steps of 3D image acquisition comprise the acquisition of a series of images, alignment of the series, segmentation and modeling. (b) Resulting images of MKs obtained using SBEM, FIB-SEM and ET.

Focused Ion Beam (FIB)-SEM

Description

In this case, a beam of gallium ions is used to remove thin layers of tissue from a sample [55]. The main advantages of FIB-SEM over SBEM are a better 3D resolution and site-specific targeting, which is a particularly valuable feature for BM samples where MKs are poorly represented (0.1% of the total cells). Using this approach, one can visualize 3D subcellular organelle interactions within a complete MK, as likewise cell-cell interactions and perform morphometric measurements. Nonetheless, SBEM and FIB-SEM have the common disadvantage of being destructive methods.

FIB-SEM Sample Preparation

Cells are prepared as for SBEM. In the microscope, the surface is examined to find the exact region of the face to be processed. Sections are then milled with a slice thickness of 7 to 20 nm (z-resolution) and each successive sample face is imaged by SEM, before the gallium ion beam shears off another layer and the process is repeated [56].

FIB-SEM to Reveal a Novel Architecture of the DMS

Using this method, we recently identified an intracellular membrane network located in the center of immature MKs, which appeared to be the first detectable form of the nascent DMS, the “pre-DMS” [20]. In another study, we investigated the cellular interactions between MKs and sinusoids and demonstrated that MKs have to find a route through the endothelium to reach the circulation and release platelets. FIB-SEM allowed us to identify specialized MK protrusions which are sites of force generation leading to the formation of transcellular pores [31].

High Resolution Electron Tomography (ET)

Description

This approach is ideal to study membrane continuities in 3D such as fission/fusion events or the spatial organization of organelles. The principle is that a thick section (200–300 nm) is tilted ± 70 degrees in the transmission electron microscope and a series of images is collected for reconstruction into a high resolution 3D tomogram (~ 2 nm axial resolution).

ET Sample Preparation

Samples are prepared as for classical TEM, except that thicker sections are cut. The acquisition of tomograms requires a microscope equipped with a goniometer allowing automatic tilting of the EM grid and with high voltage (operated at >200 kV) to enable the electron beam to pass through thicker sections. The specimens can be tilted around two orthogonal axes (dual-axis tomography), which reduces the missing-wedges information [20,38].

ET to Explore the Biogenesis of the DMS

Using this approach, we have recently characterized the membrane sources involved in the biogenesis of the DMS. Tomography revealed the fusion of Golgi-derived vesicles with the DMS as well as tight contacts between the endoplasmic reticulum (ER) and DMS with no apparent membrane continuity. These observations led us to propose that the growing DMS requires, besides invagination of the plasma membrane, the insertion of Golgi-derived membrane vesicles and ER-mediated lipid transfer [20].

Volume Reconstructions

One challenge of volume EM is to deal with large datasets. The computers must be powerful enough to analyze and store these data (Microsoft Windows 7/8/10-64 bits, 16 GB of RAM and a graphic card NVIDIA with at least 2 GB dedicated to memory). The images are loaded into the processing program, stitched together and aligned to perfectly match into each other. Segmentation is then performed, i.e., the outlines of the different subcellular structures are manually delimited. Semi-automatic tracing methods are at present the only way to reconstruct some MK features, e.g., the DMS. Several groups and companies have developed software to facilitate 3D and correlative imaging, such as Amira and Avizo (Visualization Sciences Group and FEI Company), IMOD (Boulder Laboratory, Colorado), MAPS (FEI), or TomoJ (Sergio's group at the Institut Curie, Paris).

Correlative Light and Electron Microscopy (CLEM)

CLEM defines a variety of techniques aimed at visualizing the same cell using both light microscopy (LM) and EM. This general description includes many applications where almost all combinations of fluorescent LM (on living or fixed samples) and EM (TEM, IEM and tomography) may be employed [25,57]. In this way, features identified by fluorescence microscopy, such as the colocalization of specific proteins or rare events, can be visualized by EM with high resolution, revealing the underlying subcellular structures. A crucial point in CLEM is to locate at the EM level what has previously been recorded using LM. Several strategies adapted to the type of MK under study (*in vitro* or BM MK) have been documented. Three different examples are discussed here (Figure 5).

CLEM Experiments on MK Cultures

CLEM has been employed to characterize the first steps of DMS formation during the early stages of MK development in cell cultures [20] (Figure 5a). In this study, we used CLEM to determine whether the DMS could arise *de novo* from an intracellular membrane pool. We found no evidence for an isolated internal DMS-like structure, strongly suggesting that the nascent DMS is essentially formed by invagination of the plasma membrane. In practice, fixed cells were allowed to settle on pre-patterned Aclar supports [58] and rare immature MKs were identified by immunolabeling using a platelet-specific marker or using GFP-expressing MKs. The cells were then located by LM and fluorescence microscopy with the help of the pre-patterned coordinates. After classical EM treatment and resin embedding, these coordinates were still visible on the sections, enabling retrieval of the previously visualized MKs.

CLEM Experiments on Bone Marrow Cryosections

We recently used a CLEM strategy to investigate how MKs interact with endothelial cells to cross the sinusoids. In this work, we found that MKs form F-actin-based protrusions which squeeze the endothelial cells, leading to the formation of transendothelial pores. To determine the localization of F-actin within MK protrusions, CLEM experiments on BM cryosections allowed us to superimpose phalloidin fluorescent signals on bone marrow EM images with high precision (Figure 5b). Our findings showed that the MK protrusions were composed of F-actin bundles lying perpendicular to the endothelium, suggesting that the actin cytoskeleton provides sufficient mechanical force to deform the endothelial surface. In these experiments, cryosections were prepared according to the Tokuyasu method. The cells were first examined under the fluorescence microscope and their coordinates relative to the grid were recorded before they were examined by TEM [31].

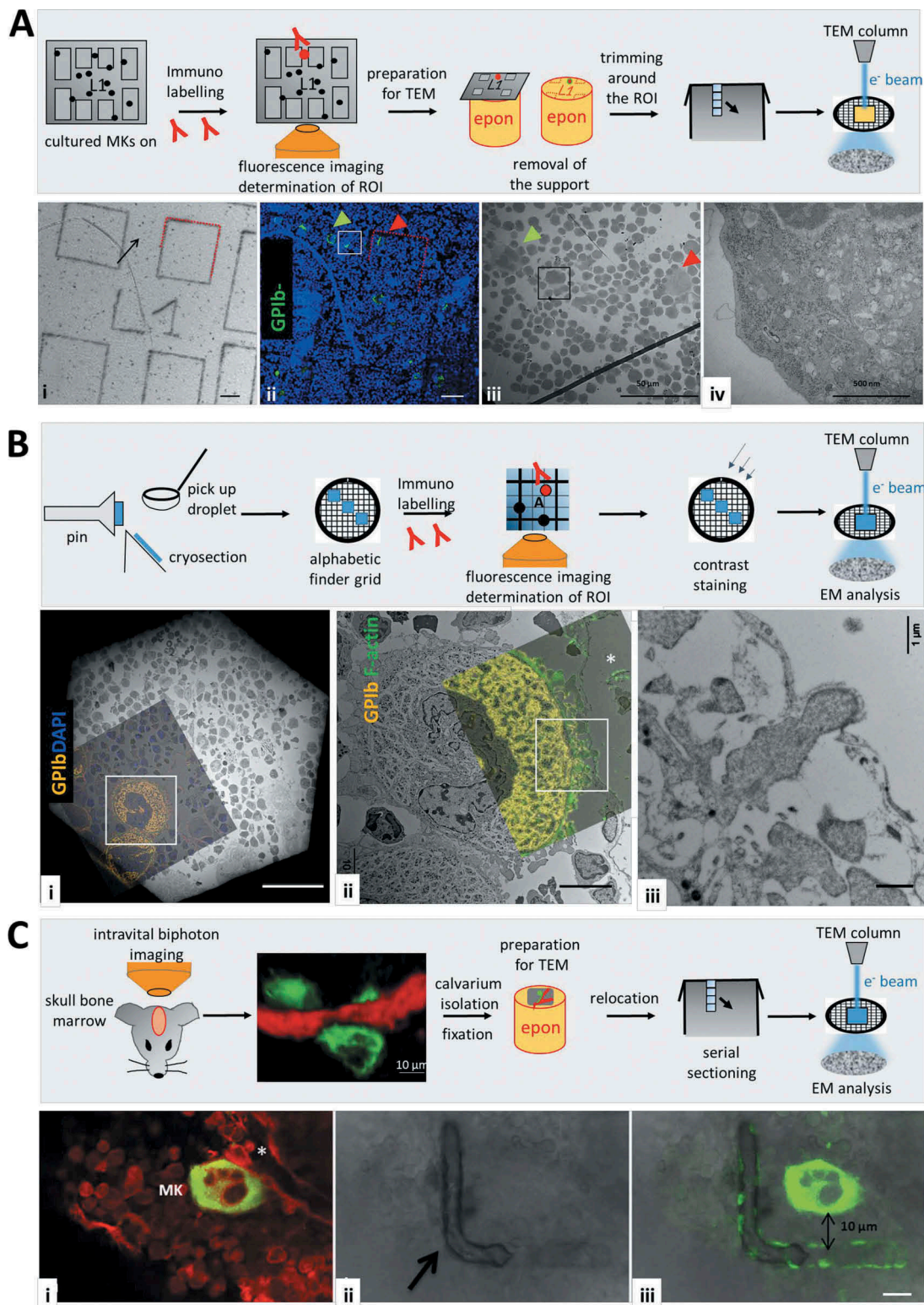


Figure 5. Overview of CLEM approaches. (a) **CLEM of cultured MKs.** Upper panel: MKs are allowed to settle on pre-patterned Aclar support, immunostained, imaged by fluorescence microscopy and then processed exactly as for TEM and ultrathin sections are prepared for EM observation. Laser micropatterning of the aclar are visible on the first thin sections thus allowing a localization of the MK of interest. Lower panel: Cells were fixed on day 2 of culture and allowed to settle on pre-patterned Aclar supports. (i-ii) A cell displaying a GPIb-positive cell surface (in green) was located by bright field microscopy (arrow in (i)) and by fluorescence microscopy (box in (ii)) using the “L1 pattern” of the two adjacent GPIb-positive cells (green and red arrows in (ii)). The pattern is visible (red dots). (iii) A correlative EM image at low magnification shows the same cell (boxed in (ii)), while the neighboring MKs are indicated with red and green arrowheads. (iv) A higher magnification electron micrograph of the boxed areas; no intracellular pre-DMS was detected on this section. (b) **CLEM of bone marrow cryosections.** Upper panel: MKs of interest are precisely located on immunostained-cryosections and first imaged by fluorescence confocal microscopy. The alphabetic finder grids are then inserted in the TEM for correlative studies. Lower panel: CLEM of bone marrow cryosections showing superimposed IF and EM images at three magnifications (i-iii). The immunostainings are indicated, the white boxes define the region of interest and the arrows indicate the presence of F-actin within an MK protrusion deforming the endothelial surface. Bars: 25 μ m in (i), 5 μ m in (ii) and 500 nm in (iii). (c) **Intravital CLEM.** Upper panel: Calvarium bone marrow is imaged using confocal intravital microscopy. To delineate the vasculature and the MKs within the bone marrow, anesthetized mice are injected intravenously with anti-glycoprotein 1b AlexaFluor488 and Cy5-dextran. Calvarium is then removed, fixed and embedded in resin. Lower panel: NIRB marking. Confocal images of a green-fluorescent MK close to a red-fluorescent sinusoid (*) in the bone marrow of a double-fluorescent Cre reporter mouse (mT/mG x Pf4-cre) before (a) and after (b-c) NIRB marking. The marking is visible in DIC and by autofluorescence (length: 50 μ m). Bar: 10 μ m.

Intravital CLEM Experiments

CLEM is most rewarding when it is used to relate dynamic events, only visible in live cells, to an ultrastructure (live-cell CLEM). By combining intravital fluorescence microscopy with EM, the elegant study of Brown et al. recently provided a direct link between the dynamic processes of MK extrusion into sinusoids and 3D ultrastructure [21]. These authors demonstrated that MKs predominantly extend into sinusoids as large protrusions. Furthermore, they established that the mechanism of protrusion migration differs from that of proplatelet extension. *In vitro*, elongation of proplatelets involves the dynein-driven sliding of microtubules, whereas microtubule bundles were not detected in the large *in vivo* protrusions, challenging the current view of how platelets are generated *in vivo*. While intravital CLEM has opened up new ways of imaging rare cellular events or structures in complex BM tissues with ultrastructural resolution, its main challenge is the localization of the MK structures on the z-axis. Thus, an innovative method has been developed using a two-photon laser to burn reference marks into the tissue, termed near infrared branding (NIRB) [59,60] (Figure 5c).

Conclusion

We have briefly reviewed the current status of the wide range of EM techniques available to study MKs, each having advantages and limitations. One solution is to combine and correlate different readouts from the same specimen, which opens new avenues to explore structure-function relationships in MKs. In particular, the combination of live-imaging and EM is promising to investigate processes occurring in fully mature MKs in their natural environment. Similarly, the recently developed volume EM approaches should enable us to visualize MKs across a range of length scales and in 3D, to localize rare cellular events or structures in complex bone marrow with ultrastructural resolution. Importantly, the use of cryo-preparation and imaging techniques will eliminate artifacts induced by plastic embedding and the staining of the samples will be circumvented. We anticipate that the recent developments in cryo-EM techniques (such as cryo-ET analysis of cryo-FIB lamellas or correlative cryo LM and TEM), will provide fresh views of unstained MKs in an unperturbed bone environment and at the molecular level. In the future, we can safely forecast that EM will remain at the forefront of research in MK biology in health and disease.

Acknowledgements

We wish to thank François Lanza and Henri de la Salle for critical reading of the chapter. We are grateful to ARMESA (Association de Recherche et Développement en Médecine et Santé Publique) and to the European Union through the European Regional Development Fund (ERDF) for EM equipments funding. We thank the ANR (Agence Nationale de la Recherche) for grant support (ANR-17-CE14-0001-01).

Authors' contributions

A.E., M.E., C.S., F.P., and J.Y.R. performed the EM and IF experiments; A.E. wrote the review; C.G. revised and approved the final version of the manuscript.

Disclosure of Conflict of Interests

The authors have no conflicts of interests to declare.

ORCID

Anita Eckly  <http://orcid.org/0000-0001-9620-4961>

References

1. Wright JH. The origin and nature of blood platelets. *Boston Med Surg J* 1906;154:643. doi:10.1056/NEJM190606071542301
2. Knoll MR. E. Das elektronenmikroskop. *ZPhys* 1932;78:318–339.
3. Palade GE. A study of fixation for electron microscopy. *J Exp Med* 1952;95(3):285–298. doi:10.1084/jem.95.3.285
4. Yamada E. The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat (Basel)* 1957;29(3):267–290. doi:10.1159/000141169
5. Zucker-Franklin D, Petursson S. Thrombocytopoiesis—analysis by membrane tracer and freeze-fracture studies on fresh human and cultured mouse megakaryocytes. *J Cell Biol* 1984;99(2):390–402. doi:10.1083/jcb.99.2.390
6. Zucker-Franklin D, Stahl C, Hyde P. Megakaryocyte ultrastructure. Its relationship to normal and pathologic thrombocytopoiesis. *Ann N Y Acad Sci* 1987;509:25–33. doi:10.1111/nyas.1987.509.issue-1
7. Becker RP, De Bruyn PP. The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *Am J Anat* 1976;145(2):183–205. doi:10.1002/aja.1001450204
8. Muto M. A scanning and transmission electron microscopic study on rat bone marrow sinusoids and transmural migration of blood cells. *Arch Histol Jpn* 1976;39(1):51–66. doi:10.1679/aohc1950.39.51
9. Thiery JP, Bessis M. Genesis of blood platelets from the megakaryocytes in living cells. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1956;242(2):290–292.
10. Radley JM, Haller CJ. The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood* 1982;60(1):213–219. doi:10.1182/blood.V60.1.213.213
11. Tablin F, Castro M, Leven RM. Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *J Cell Sci* 1990;97(Pt 1):59–70.
12. Metcalf D. Blood. Thrombopoietin—at last. *Nature* 1994;369(6481):519–520. doi:10.1038/369519a0
13. Handagama PJ, Jain NC, Feldman BF, Kono CS. Scanning electron microscope study of platelet release by canine megakaryocytes in vitro. *Am J Vet Res* 1987;48(6):1003–1006.
14. Leven RM, Yee MK. Megakaryocyte morphogenesis stimulated in vitro by whole and partially fractionated thrombocytopenic plasma: a model system for the study of platelet formation. *Blood* 1987;69(4):1046–1052. doi:10.1182/blood.V69.4.1046.1046
15. Radley JM, Hartshorn MA. Megakaryocyte fragments and the microtubule coil. *Blood Cells* 1987;12(3):603–614.
16. Topp KS, Tablin F, Levin J. Culture of isolated bovine megakaryocytes on reconstituted basement membrane matrix leads to proplatelet process formation. *Blood* 1990;76(5):912–924. doi:10.1182/blood.V76.5.912.912
17. Cramer EM, Norol F, Guichard J, Breton-Gorius J, Vainchenker W, Massé JM, Debili N. Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand. *Blood* 1997;89(7):2336–2346. doi:10.1182/blood.V89.7.2336
18. Choi ES, Hokom MM, Nichol JL, Hornkohl A, Hunt P. Functional human platelet generation in vitro and regulation of cytoplasmic process formation. *C R Acad Sci III* 1995;318(3):387–393.
19. Italiano JE Jr., Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol* 1999;147(6):1299–1312. doi:10.1083/jcb.147.6.1299
20. Eckly A, Heijnen H, Pertuy F, Geerts W, Proamer F, Rinckel JY, Léon C, Lanza F, Gachet C. Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood* 2014;123(6):921–930. doi:10.1182/blood-2013-03-492330
21. Brown E, Carlin LM, Nerlov C, Lo Celso C, Poole AW. Multiple membrane extrusion sites drive megakaryocyte migration into bone marrow blood vessels. *Life Sci Alliance* 2018;1(2). doi:10.26508/lsa.201800061
22. Behnke O, Forer A. From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eur J Haematol Suppl* 1998;61:3–23. doi:10.1111/j.1600-0609.1998.tb01052.x
23. Zucker-Franklin D. Megakaryocytes and platelets. In: Zucker-Franklin D, Grossi CE, editors. *Atlas of blood cells, Function and pathology*. 3rd ed. Milano: Edi. Ermzq s.r.l.; 2003. Vol. 2. p. 755–863.

24. 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.
25. Engberts KB, Seinen C, Geerts WJC, Heijnen HFG. Electron Tomography and Correlative Approaches in Platelet Studies. *Methods Mol Biol* 2018;1812:55–79.
26. Heijnen HF, Debili N, Vainchenker W, Breton-Gorius J, Geuze HJ, Sixma JJ. Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules. *Blood* 1998;91(7):2313–2325. doi:10.1182/blood.V91.7.2313
27. Youssefian T, Cramer EM. Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies. *Blood* 2000;95(12):4004–4007. doi:10.1182/blood.V95.12.4004.010k03_4004_4007
28. Italiano JE Jr., Patel-Hett S, Hartwig JH. Mechanics of proplatelet elaboration. *J Thromb Haemost* 2007;5(Suppl 1):18–23. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02487.x
29. Patel SR, Richardson JL, Schulze H, Kahle E, Galjart N, Drabek K, Shivdasani RA, Hartwig JH, Italiano JE Jr. Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood* 2005;106(13):4076–4085. doi:10.1182/blood-2005-06-2204
30. Eckly A, Strassel C, Freund M, Cazenave JP, Lanza F, Gachet C, Léon C. Abnormal megakaryocyte morphology and proplatelet formation in mice with megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation. *Blood* 2009;113(14):3182–3189. doi:10.1182/blood-2008-06-164061
31. Eckly ARJY, Proamer F, Lanza F, de la Salle H, Gachet C. Ultrastructural characterization of the cellular contacts between megakaryocytes and endothelial cells in the bone marrow. *Res Pract Thromb Haemost* 2017;1(Suppl 1):224.
32. Mobius W, Posthuma G. Sugar and ice: immunoelectron microscopy using cryosections according to the Tokuyasu method. *Tissue Cell* 2019;57:90–102. doi:10.1016/j.tice.2018.08.010
33. Slot JW, Geuze HJ. Cryosectioning and immunolabeling. *Nat Protoc* 2007;2(10):2480–2491. doi:10.1038/nprot.2007.365
34. Handagama P, Rappolee DA, Werb Z, Levin J, Bainton DF. Platelet alpha-granule fibrinogen, albumin, and immunoglobulin G are not synthesized by rat and mouse megakaryocytes. *J Clin Invest* 1990;86(4):1364–1368. doi:10.1172/JCI114848
35. Harrison P, Wilbourn B, Debili N, Vainchenker W, Breton-Gorius J, Lawrie AS, Masse JM, Savidge GF, Cramer EM. Uptake of plasma fibrinogen into the alpha granules of human megakaryocytes and platelets. *J Clin Invest* 1989;84(4):1320–1324. doi:10.1172/JCI114300
36. Handagama PJ, Shuman MA, Bainton DF. Incorporation of intravenously injected albumin, immunoglobulin G, and fibrinogen in guinea pig megakaryocyte granules. *J Clin Invest* 1989;84(1):73–82. doi:10.1172/JCI114173
37. Cramer EM, Vainchenker W, Vinci G, Guichard J, Breton-Gorius J. Gray platelet syndrome: immunoelectron microscopic localization of fibrinogen and von Willebrand factor in platelets and megakaryocytes. *Blood* 1985;66(6):1309–1316. doi:10.1182/blood.V66.6.1309.1309
38. van Nispen Tot Pannerden H, de Haas F, Geerts W, Posthuma G, van Dijk S, Heijnen HF. The platelet interior revisited: electron tomography reveals tubular alpha-granule subtypes. *Blood* 2010;116(7):1147–1156. doi:10.1182/blood-2010-02-268680
39. Bender M, Stritt S, Nurden P, van Eeuwijk JM, Zieger B, Kentouche K, Schulze H, Morbach H, Stegner D, Heinze KG, et al. Megakaryocyte-specific Profilin1-deficiency alters microtubule stability and causes a Wiskott-Aldrich syndrome-like platelet defect. *Nat Commun* 2014;5:4746. doi:10.1038/ncomms5746
40. Tavassoli M. Fusion-fission reorganization of membrane: a developing membrane model for thrombocytogenesis in megakaryocytes. *Blood Cells* 1979;5(1):89–99.
41. Shaklai M, Tavassoli M. Demarcation membrane system in rat megakaryocyte and the mechanism of platelet formation: a membrane reorganization process. *J Ultrastruct Res* 1978;62(3):270–285. doi:10.1016/S0022-5320(78)80023-9
42. Begonja AJ, Pluthero FG, Suphamungmee W, Giannini S, Christensen H, Leung R, Lo RW, Nakamura F, Lehman W, Plomann M, et al. FlnA binding to PACSIN2 F-BAR domain regulates membrane tubulation in megakaryocytes and platelets. *Blood* 2015;126(1):80–88. doi:10.1182/blood-2014-07-587600
43. Chen Y, Aardema J, Kale S, Whichard ZL, Awomolo A, Blanchard E, Chang B, Myers DR, Ju L, Tran R, et al. Loss of the F-BAR protein CIP4 reduces platelet production by impairing membrane-cytoskeleton remodeling. *Blood* 2013;122(10):1695–1706. doi:10.1182/blood-2013-03-484550
44. Bruyn PP, Becker RP, Michelson S. The transmembrane migration and release of blood cells in acute myelogenous leukemia. *Am J Anat* 1977;149(2):247–267. doi:10.1002/aja.1001490208
45. De Bruyn PP, Michelson S, Thomas TB. The migration of blood cells of the bone marrow through the sinusoidal wall. *J Morphol* 1971;133(4):417–437. doi:10.1002/jmor.1051330406
46. Kowata S, Isogai S, Murai K, Ito S, Tohyama K, Ema M, Hitomi J, Ishida Y. Platelet demand modulates the type of intravascular protrusion of megakaryocytes in bone marrow. *Thromb Haemost* 2014;112(4):743–756. doi:10.1160/TH14-02-0123
47. Lichtman MA, Chamberlain JK, Simon W, Santillo PA. Parasinusoidal location of megakaryocytes in marrow: a determinant of platelet release. *Am J Hematol* 1978;4(4):303–312. doi:10.1002/(ISSN)1096-8652
48. Radley JM, Scurfield G. The mechanism of platelet release. *Blood* 1980;56(6):996–999. doi:10.1182/blood.V56.6.996.996
49. Scurfield G, Radley JM. Aspects of platelet formation and release. *Am J Hematol* 1981;10(3):285–296. doi:10.1002/(ISSN)1096-8652
50. Tavassoli M, Aoki M. Migration of entire megakaryocytes through the marrow–blood barrier. *Br J Haematol* 1981;48(1):25–29. doi:10.1111/j.1365-2141.1981.00025.x
51. Hayworth KJ, Morgan JL, Schalek R, Berger DR, Hildebrand DG, Lichtman JW. Imaging ATUM ultrathin section libraries with WaferMapper: a multi-scale approach to EM reconstruction of neural circuits. *Front Neural Circuits* 2014;8:68. doi:10.3389/fncir.2014.00068
52. Micheva KD, O'Rourke N, Busse B, Smith SJ. Array tomography: high-resolution three-dimensional immunofluorescence. *Cold Spring Harb Protoc* 2010;2010(11):pdbtop89. doi:10.1101/pdb.top89
53. Denk W, Horstmann H. Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biol* 2004;2(11):e329. doi:10.1371/journal.pbio.0020329
54. Stegner D, vanEeuwijk JMM, Angay O, Gorelashvili MG, Semeniak D, Pinnecker J, Schmithausen P, Meyer I, Friedrich M, Dütting S, et al. Thrombopoiesis is spatially regulated by the bone marrow vasculature. *Nat Commun* 2017;8(1):127. doi:10.1038/s41467-017-00201-7
55. Knott G, Marchman H, Wall D, Lich B. Serial section scanning electron microscopy of adult brain tissue using focused ion beam milling. *J Neurosci* 2008;28(12):2959–2964. doi:10.1523/JNEUROSCI.3189-07.2008
56. Eckly A, Rinckel JY, Proamer F, Gachet C. High-resolution 3D imaging of megakaryocytes using focused ion beam-scanning electron microscopy. *Methods Mol Biol* 2018;1812:217–231.
57. Karreman MA, Hyenne V, Schwab Y, Goetz JG. Intravital correlative microscopy: imaging life at the nanoscale. *Trends Cell Biol* 2016;26(11):848–863. doi:10.1016/j.tcb.2016.07.003
58. Spiegelhalter C, Tosch V, Hentsch D, Koch M, Kessler P, Schwab Y, Laporte J. From dynamic live cell imaging to 3D ultrastructure: novel integrated methods for high pressure freezing and correlative light-electron microscopy. *PLoS One* 2010;5(2):e9014. doi:10.1371/journal.pone.0009014
59. Bishop D, Nikic I, Brinkoetter M, Knecht S, Potz S, Kerschensteiner M, Misgeld T. Near-infrared branding efficiently correlates light and electron microscopy. *Nat Methods* 2011;8(7):568–570. doi:10.1038/nmeth.1622
60. Maco B, Holtmaat A, Cantoni M, Kreshuk A, Straehle CN, Hamprecht FA, Knott GW. Correlative in vivo 2 photon and focused ion beam scanning electron microscopy of cortical neurons. *PLoS One* 2013;8(2):e57405. doi:10.1371/journal.pone.0057405

In Situ Exploration of Murine Megakaryopoiesis using Transmission Electron Microscopy

Cyril Scandola¹, François Lanza¹, Christian Gachet¹, Anita Eckly¹

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

Corresponding Author

Anita Eckly
Anita.Michel@efs.sante.fr

Citation

Scandola, C., Lanza, F., Gachet, C., Eckly, A. *In Situ* Exploration of Murine Megakaryopoiesis using Transmission Electron Microscopy. *J. Vis. Exp.* (), e62494, doi:10.3791/62494 (2021).

Date Published

March 26, 2021

DOI

10.3791/62494

URL

jove.com/t/62494

Abstract

Differentiation and maturation of megakaryocytes occur in close association with the cellular and extracellular components of the bone marrow. These processes are characterized by the gradual appearance of essential structures in the megakaryocyte cytoplasm such as a polyploid and polylobulated nucleus, an internal membrane network called demarcation membrane system (DMS) and the dense and alpha granules that will be found in circulating platelets. In this article, we describe a standardized protocol for the *in situ* ultrastructural study of murine megakaryocytes using transmission electron microscopy (TEM), allowing for the identification of key characteristics defining their maturation stage and cellular density in the bone marrow. Bone marrows are flushed, fixed, dehydrated in ethanol, embedded in plastic resin, and mounted for generating cross-sections. Semi-thin and thin sections are prepared for histological and TEM observations, respectively. This method can be used for any bone marrow cell, in any EM facility and has the advantage of using small sample sizes allowing for the combination of several imaging approaches on the same mouse.

Introduction

Megakaryocytes are specialized large polyploid cells, localized in the bone marrow, responsible for platelet production¹. They originate from hematopoietic stem cells through an intricate maturation process, during which megakaryocyte precursors progressively increase in size, while undergoing extensive concomitant morphologic changes in the cytoplasm and nucleus². During maturation, megakaryocytes develop a number of distinguishable structural elements including: a polylobulated nucleus, invaginations of the surface membrane that form the

demarcation membrane system (DMS), a peripheral zone devoid of organelles surrounded by the actin based cytoskeletal network, and numerous organelles including α -granules, dense granules, lysosomes, and multiple Golgi complexes. At the ultrastructural level, a major modification observed is the cytoplasmic compartmentalization into discrete regions delimited by the DMS³. This extensive supply of membranes will fuel the extension of long cytoplasmic processes in the initial phase of platelet production, which will then remodel into platelets inside the

circulation. Any defect during megakaryocyte differentiation and maturation can affect platelet production in term of platelet count and/or platelet function.

Thin layer transmission electron microscopy (TEM) has been the imaging approach of choice for decades providing high-quality ultrastructure of megakaryocytes that have shaped our understanding of the physiology of thrombopoiesis^{4,5}. This paper focuses on a standardized TEM method allowing to capture the process of platelet biogenesis occurring *in situ* within the native bone marrow microenvironment, which could also serve as a basis to analyze any bone marrow cell type. We provide ultrastructural examples of the development of megakaryocytes from immature to fully mature, which extend cytoplasmic processes into the microcirculation of sinusoids⁶. We also describe an easy procedure to quantify the different megakaryocyte maturation stages, instructing on the regeneration and platelet production capacity of the bone marrow.

Protocol

All animal experiments were performed in accordance with European standards 2010/63/EU and the CREMEAS Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Strasbourg (Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale Strasbourg). The protocol is schematically shown in **Figure 1**.

1. Bone marrow collection and fixation (Figure 1A)

CAUTION: This procedure includes carcinogenic, mutagenic, and/or toxic substances and is performed under a chemical extraction hood. Wear appropriate protective equipment such as gloves and protections glasses.

1. Prepare the fixative solution consisting of 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer (see **Supplementary File**).
2. Bone marrow collection
 1. Use adult C57BL/6 mice of either sex 12-18 weeks of age. Euthanize the mice by CO₂ asphyxiation and cervical dislocation.
 2. With a pair of thin scissors, cut the skin around the thigh and use tweezers to peel the skin off. Remove the extremity of the paw and then cut between the hip and thigh. Detach tibia from femur by cutting at the knee articulation and remove adherent tissue on tibias and femurs by using a scalpel.
 3. Remove the epiphyses with a sharp razor blade. While holding the femur with tweezers, use a 5 mL syringe filled with cacodylate buffer with a 21 G needle to flush the bone marrow into a 15 mL tube filled with 2 mL cacodylate buffer. To do so, insert the bevel of the needle into the bone marrow opening and slowly press the plunger until the marrow is expelled.
3. Bone marrow fixation by rapid immersion into fixative.
 1. Immediately after flushing, use a plastic pipette to transfer the bone marrow cylinder into 1 mL of fresh glutaraldehyde fixative solution (previously prepared in 1.1) for 60 min at room temperature.

NOTE: To preserve the tissue, ensure that the entire process, from bone dissection to the fixation step, is completed in less than 10 min. For the fixation, ensure that the fixative solution is at room temperature to avoid heat shock.

2. Embedding bone marrow in agarose

NOTE: Marrow tissue is not sufficiently cohesive to maintain its integrity during the different washing steps and material can be easily lost. To overcome this problem, the marrow is covered in a gel of agar before dehydration.

1. Prepare the agarose solution as described in the **Supplementary File**.
2. Wash the fixed marrow from section 1.3 in cacodylate buffer and transfer it carefully to a glass slide using a plastic pipette. Using a warm pipette, quickly apply a drop of 2% liquid agar to the bone marrow cylinder.

NOTE: The agar solidifies quickly while cooling. To ensure a homogenous covering of the bone marrow, the agar solution has to be kept warm until it is deposited onto the slide.
3. Quickly place the slide rapidly on ice until the agar solidifies (1-2 min).
4. Under a microscope, use a sharp razor blade to cut and discard the extremities of the bone marrow cylinder because of possible tissue compression in these areas. Transfer the marrow blocks in 1.5 mL microcentrifuge tubes containing 1 mL of cacodylate buffer.

3. Embedding bone marrow in resin

CAUTION: Resin components are toxic; some are carcinogenic and must be handled with care under a chemical extraction hood. Use appropriate protective equipment such as gloves and protection glasses. Osmium tetroxide is highly volatile at room temperature and its vapors are very harmful to the eyes, nose, and throat. Before being discarded, 2% osmium tetroxide must be neutralized by adding twice its volume of vegetable oil.

1. Prepare the epoxy resin as described in the **Supplementary File**.
2. Resin embedding

NOTE: Keep the samples in the same microcentrifuge tubes during incubations in successive baths of osmium, uranyl acetate and ethanol. Aspirate the supernatants with a Pasteur pipette. The volume of solution used for each bath must equal at least 10x the volume of the sample.

 1. Post-fix the blocks with 1% osmium in cacodylate buffer for 1 h at 4 °C, wash once in cacodylate buffer and then once in distilled water.
 2. Stain with 4% uranyl acetate in distilled water for 1 h, wash twice in distilled water.
 3. Dehydrate through a graded series of ethanol in distilled water: 4 times in 75% ethanol for 5 min, followed by 3 times in 95% ethanol for 20 min and then 3 times in 100% ethanol for 20 min. At this step, take one syringe of epoxy resin out from the freezer.

NOTE: The protocol can be paused in 100% ethanol for 1 h.
 4. To obtain uniform infiltration and polymerization of epoxy resin inside the marrow, incubate first the blocks in 2 successive baths of propylene oxide for 15 min.
 5. Add a 1:1 mixture of 100% propylene oxide and epoxy resin and incubate for 1 h. Place the samples on a slow rotary shaker at room temperature.
 6. Add 100% epoxy resin leave the sample for overnight incubation under agitation.
 7. Add 100% epoxy resin for 2 h incubation, still under agitation.

- Under a microscope, place the marrow blocks into flat silicone molds. Orientate samples to permit subsequent transversal sectioning of the entire bone marrow. Fill the molds with epoxy resin and place them at 60 °C for 48 h.

NOTE: All solutions (except ethanol and propylene oxide) are filtered through 0.22 µm filter to avoid samples contamination. To ensure adequate polymerization of the resin, avoid bubbles while filling the molds.

4. Ultrathin sectioning (Figure 1B)

NOTE: Transmission EM requires thin tissue sections through which electrons can pass generating a projection image of the interior of cells, structure, and organization of inner organelles (granules, endoplasmic reticulum, Golgi) and the arrangement of intracellular cell membranes.

- Mount the sample block in an ultra-microtome support. Put it on the sample holder. Trim the samples at 45° in order to remove the excess of resin around the tissue with a rotating diamond or tungsten milling cutter.
- Mount the samples on the ultramicrotome with a diamond knife blade equipped with a water tank. Cut transverse sections of 500 nm and 100 nm thickness for histological and TEM analyses, respectively. Collect floating sections on the water-surface with a loop.
- Deposit the 500 nm thick section on a glass slide and 100 nm thick sections on 200 mesh thin-bar copper grids with a paper filter underneath. Prepare five grids for one condition: stain two grids first and keep the three remaining grids as a backup if necessary.

5. Toluidine blue staining for histology

NOTE: Staining sections for histology is important for three reasons: 1) to make sure that the tissue is actually cut and not the resin, 2) to check the quality of the inclusion, and 3) to rapidly evaluate the marrow sample. If this is not correct, cut deeper in the block.

- Dry the semi-thin sections slide on a heat plate (60 °C).
- Add filtered 1% toluidine blue/1 % sodium borate in distilled water on the slides and heat on a hot plate (60 °C) for 1-2 min. Wash the slides with distilled water and let it dry on the heat plate.
- Mount sections on coverslips with a drop of Poly(butyl methacrylate-co-methyl methacrylate) mounting medium and examine under a light microscope.

6. Heavy metal staining for TEM observation (Figure 1C)

NOTE: For the contrast, the upper side of the grids are inverted on 100 µL drops of each successive bath with a loop. Prior to use, each solution is 0.22 µm filtered. Remove the excess of liquid between each bath by gently contact the grid side on a filter paper.

- Stain with 4% uranyl acetate in distilled water for 5 min.
- Wash 3 times in distilled water for 5 min.
- Stain with lead citrate for 3 min.
- Wash 3 times in distilled water for 5 min.
- Deposit the grids by the lower side in contact with the filter paper to let them dry.

NOTE: Heavy metals react in the presence of carbon dioxide. To minimize the precipitates, avoid air

displacement during the contrast, do not speak, keep the environment calm and turn off the air-conditioning.

7. TEM (Figure 1E)

NOTE: The sections are introduced in a TEM microscope and examined at 120 kV.

1. First examine the sections at low magnification (< 500x) to appreciate the general aspect of the preparation (absence of hole in the resin, folds/compression in the sections, precipitates due to staining).
2. Then examine the sections at higher magnification (~ 2000x allowing to distinguish the stage of maturation). Count manually the megakaryocytes from each stage of maturation over whole transversal sections (see Representative Results on how to visually identify each stage).
3. To assess the number of megakaryocytes, quantify only the squares that are fully covered with a section. To do so, use a model based on the screening of ranges. Observe a first range of squares from an extremity of the section to another, then another range in the same way, etc. Using this procedure, screen fully and systematically the whole marrow transversal section square by square.
4. For each square, score the number of Stage I, II or III megakaryocytes.

NOTE: Higher magnifications are required to analyze the granules, the DMS organization, the size of cytoplasmic territories and the polylobulated nucleus.

Representative Results

Bone marrow histology

Observation of the bone marrow toluidine blue histology under a light microscope is key to rapidly analyze the overall tissue architecture in terms of e.g., tissue compactness, microvessel continuity, and the size and shape of megakaryocytes (**Figure 1D**). It is performed before ultrathin sections to determine the need of cutting deeper in the bone marrow block. Due to their giant size and nuclear lobulation, the more mature megakaryocytes may be easily visualized with a 40x objective. This gives an excellent and rapid overview of the density of mature megakaryocytes in the tissue and their relative localization to the microvessels. Anomalies in megakaryocyte proliferation and maturation could already be detected in such semi-thin sections.

Bone marrow ultrastructure

On the basis of distinct ultrastructural characteristics, murine megakaryocytes are divided into 4 stages representing sequential stages in their maturation (**Figure 2A**). Stage I megakaryocytes are 10-15 μm in diameter with a large nucleus occupying most of the cell and containing abundant ribosomes and rough endoplasmic reticulum. The presence of the earliest detectable stage of the DMS, called pre-DMS, is also a key criterion for distinguishing stage I MKs in TEM analysis³. In the stage II of maturation, granule formation begins and the development of the DMS is initiated. Megakaryocytes increase in size, measuring 15-25 μm in diameter and develop nuclear lobulation. Mature stage III megakaryocytes are giant cells 25-50 μm in diameter. Their cytoplasm contains a well-developed DMS with clearly defined cytoplasmic territories and a peripheral zone devoid of organelles. At this stage, the nucleus is generally located eccentrically and appears very irregular with

condensed chromatin located at the nuclear membrane. The last step is characterized by a naked nucleus, also called pyrenocyte, consisting of a large nucleus surrounded by a plasma membrane after the bulk of cytoplasm has been eliminated. In wild type C57BL/6 mice, the bone marrow comprises about 8% stage I, 20% stage II, 71% stage III megakaryocytes and < 1% pyrenocytes. The average number of megakaryocytes is between 1.7 and 2.2 cells per square. This arbitrary classification allows to conveniently monitor a continuous process of cell differentiation and detect its possible anomalies.

Beside these classical stages of maturation, observation of fixed megakaryocytes in the bone marrow allows to analyze the series of events occurring as megakaryocytes interact with the sinusoidal wall (**Figure 2B**). Megakaryocytes in contact with the endothelial cells are frequently observed in thin sections. On occasion one observes megakaryocytes forming short invasive protrusions penetrating the endothelium or extending large projection of its cytoplasm into the sinusoidal lumen^{7,8}. Remarkably, these intravascular cytoplasmic processes display variable sizes, lengths, and diameters, illustrating the progressive platelet remodeling in the circulation. Platelets already present in the

general circulation, having a discoid shape maintained by circumferential microtubule coils, are also visible in the lumen of the sinusoids. This typical morphology of the platelets is indicative of the correct fixation of the specimen.

Transmission electron microscopy has the level of resolution required to visualize ultrastructural details, such as nuclear lobulation, spatial organization of the DMS and granules in terms of size, shape, and distribution. **Figure 2C** is an example of the perinuclear region in a stage III megakaryocyte showing the presence of α granules, Golgi cisternae, mitochondria, and endoplasmic reticulum. Also noteworthy in **Figure 2C** is a multivesicular body, which represents an intermediate stage in the formation of alpha and dense granules, containing multiples exosomes measuring less than 200 Å in diameter^{9,10}. Finally, transmission electron microscopy enables to visualize neutrophils and other hematopoietic cells present inside the megakaryocytes, (**Figure 2D**) following an uncommon process called emperipolesis whereby a cell penetrates another living cell¹¹. This process, which concerns 4% of megakaryocytes in normal physiological condition, can be significantly increased in certain pathological conditions¹².

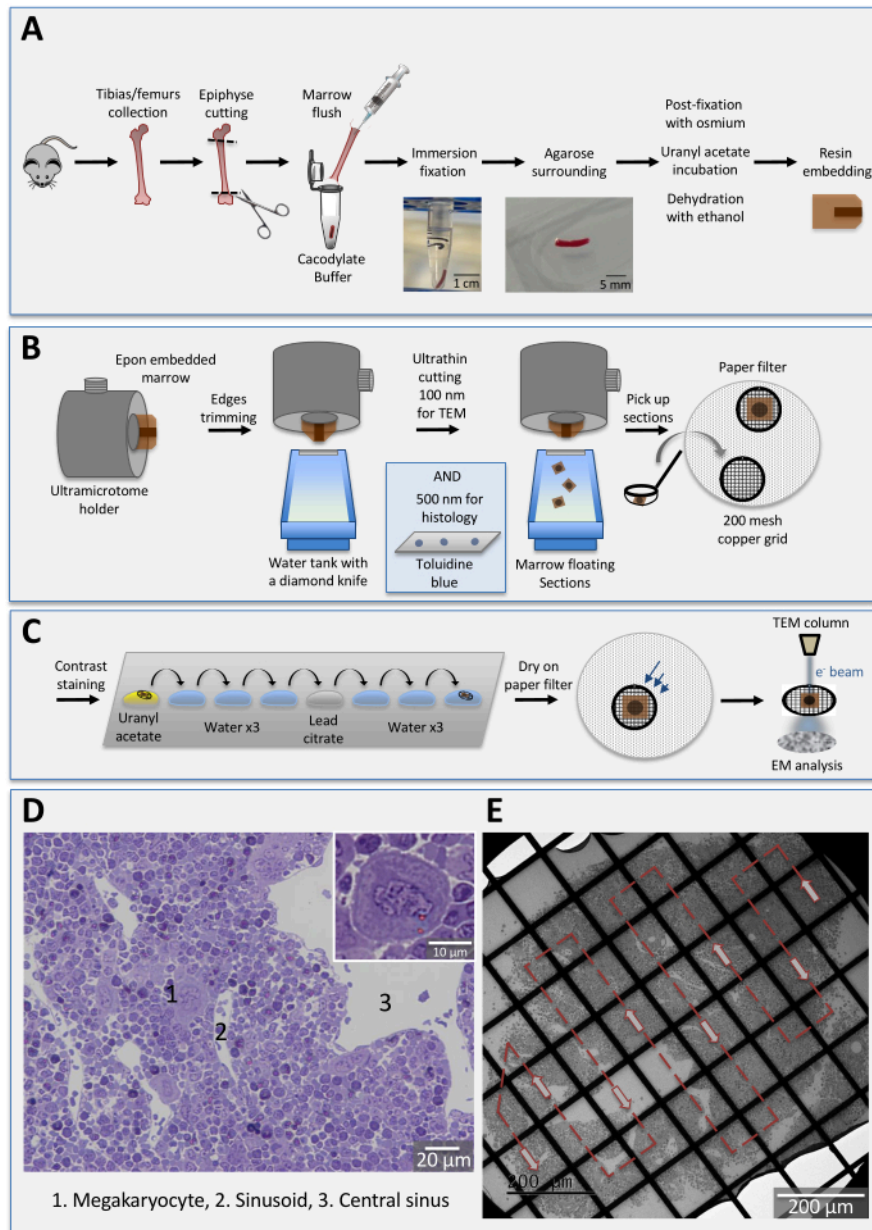


Figure 1: Schematic illustration of the experimental setup. (A) Bone marrow embedding procedure. The bone marrow is flushed and fixed by rapid immersion in glutaraldehyde solution. The photograph illustrates the typical appearance of the bone marrow cylinder following flushing. After 1 h fixation at room temperature, the marrow is surrounded in agarose, post-fixed in osmium tetroxide and incubated in uranyl acetate. The tissues are then rinsed in buffer, dehydrated in a series of graded ethanol, incubated in propylene oxide and infiltrated with epoxy resin. (B) Bone marrows blocks sectioning. The embedded bone marrow is mounted on an ultramicrotome holder, trimmed at 45° and cut either in semi-thin (500 nm) or thin (100 nm) sections. For ultrastructural studies, the floating sections are picked up with a loop and deposited on grids with

a paper filter underneath. **(C)** Contrast staining for TEM observations. Grids are inverted on uranyl acetate drops, washed on distilled water drops and incubated on lead citrate before another run of washings. After drying (upper side with the sections), the samples are ready to be examined under the TEM. **(D)** Histology of a mouse femoral marrow section stained with toluidine blue. The giant cells correspond to mature megakaryocytes (1), some being in contact with sinusoids (2). The sinusoids converge on a large central sinus vein (3). Bar: 20 μm . Inset: Normal appearance of a mature megakaryocyte at 40x magnification. **(E)** Representative TEM image of a bone marrow section at low magnification. Cells are tightly packed with little extracellular space. Each grid square of the section is observed from an extremity to another by following the schematic arrowed path (red arrows). Bar: 200 μm . [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

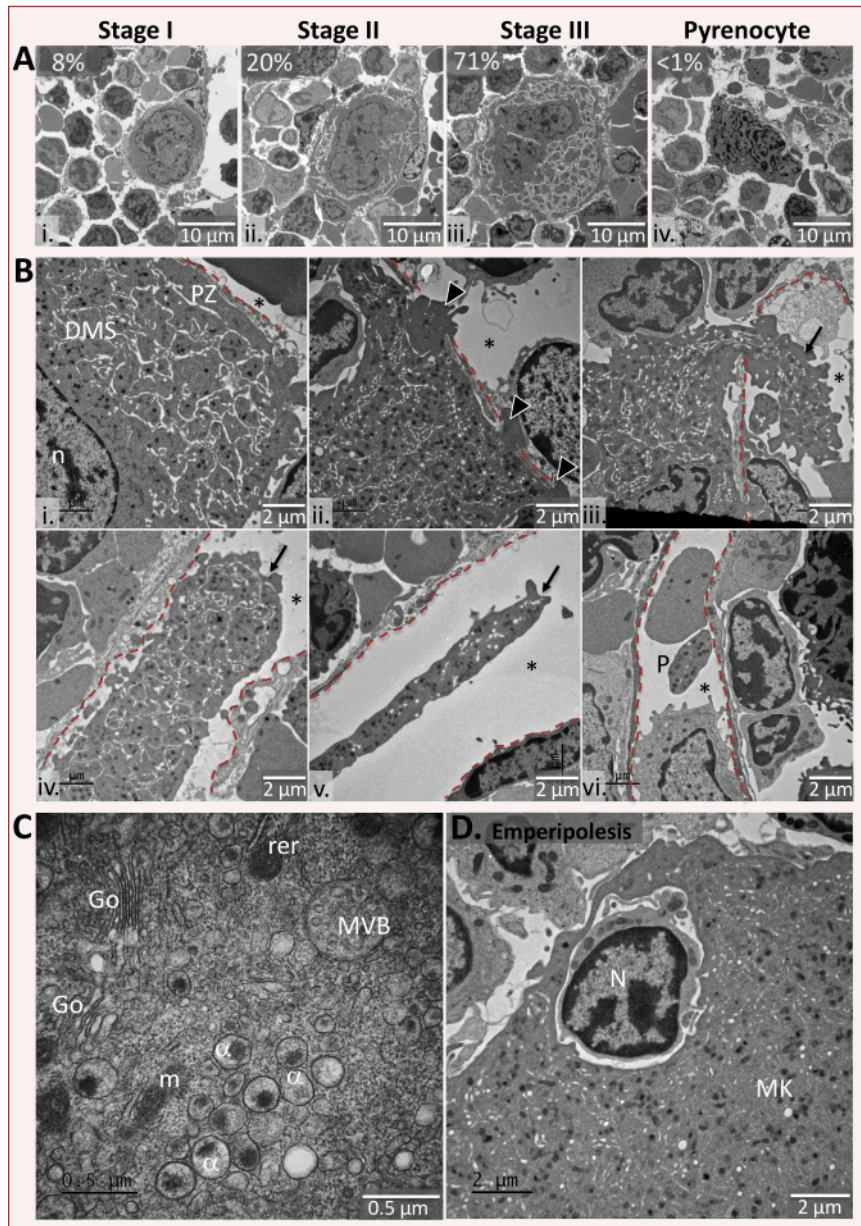


Figure 2: Representative *in situ* images of megakaryocyte ultrastructure. (A) Characteristic maturation stages of wild-type megakaryocytes. Megakaryocytes are classified in four maturation stages: Stage I, a cell 10-15 μm in diameter with a large nucleus; stage II, a cell 15-30 μm in diameter containing the DMS under development; stage III, a 30-50 μm cell containing a well-developed demarcation membrane system (DMS) defining cytoplasmic territories and having an organelle-free peripheral zone. A pyrenocyte corresponds to the naked polylobulated nucleus remaining in the bone marrow following full cytoplasmic extension. Bars: 10 μm (B) Megakaryocyte-endothelial cell interactions and intravascular cytoplasmic processes. (i) The peripheral zone (PZ) of a megakaryocyte is closely apposed to the abluminal surface of the

sinusoidal endothelium. (ii) A megakaryocyte forming short invasive protrusions that penetrate deeply into the endothelial layer (arrowheads). (iii-v) The arrows indicate cytoplasmic processes of megakaryocytes with varying diameters, some of which are very large and have a peripheral zone that may represent fragments that have just entered the bloodstream. (vi) A typical discoid platelet (P) observed in the sinus lumen. In each micrograph, the red line indicates the luminal side of the endothelial barrier and the star indicates the sinusoid lumen. Bars: 2 μm . (C) Higher magnifications of the perinuclear region of a mature megakaryocyte. α , alpha granule; rer, rough endoplasmic reticulum; G, golgi; MVB, multivesicular body; m, mitochondria. Bar: 0.5 μm . (D) Example of a megakaryocyte showing emperipoiesis. The engulfed neutrophil appears morphologically unaltered by the interaction with megakaryocytes. Bar: 2 μm . [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Supplementary File: Preparation of the reagents. [Please click here to download this File.](#)

Discussion

Direct examination of megakaryocytes in their native environment is essential to understand megakaryopoiesis and platelet formation. In this manuscript, we provide a transmission electron microscopy method combining bone marrow flushing and fixation by immersion, allowing to dissect *in situ* the morphology characteristics of the entire process of megakaryocyte morphogenesis taking place in the bone marrow.

The flushing of the bone marrow is a critical step of this method, as the success of a high-quality flushing depends on the practice and training of the operator. Although delicate, flushing the bone marrow is the best way to avoid removal of the mineralized bone, which usually requires a 2-week EDTA treatment for complete decalcification associated with significant artifacts on the megakaryocyte morphology. Additionally, a major advantage of collecting whole unfixed bone marrows from tibia and femurs is the ability to combine several imaging approaches to the same mouse. In practice, only a single bone marrow is required for the ultrastructural study, the other three specimens being available for complementary analyses. The second bone marrow can then

be used for the preparation of fresh bone marrow explants, to study in real-time the dynamics of proplatelet formation of native megakaryocytes⁶. The third sample is usually designed for immunostaining studies on thick sections, providing 3D imaging and distribution of megakaryocytes within their natural environment. The last sample can be frozen and stored for further studies by immunogold electron microscopy, where the subcellular localization of proteins is investigated at high resolution⁴. These combined imaging methods, together with the availability of the targeted deletion/mutation of genes in a mouse, provide an important means of delineating *in situ* the biological role of a given protein in thrombopoiesis. However, it should be pointed out here that one limitation of this method is the withdrawal of the epiphyses needed to flush the marrow. Epiphyses are known to be important areas for hematopoiesis, and their removal therefore hinders any possibility of analyzing hematopoietic stem cells and the initial phases of engagement¹³. Another limitation is that progenitors of megakaryocytes before the immature stage I cannot be identified because these cells do not have specific ultrastructural features. To overcome this limitation, an EM immunogold approach could be used.

The second important step of the method is the bone marrow fixation by immersion. When performed under the

conditions described here, i.e., fixation immediately after flushing out the compact bone marrow cylinder, it has the following advantages: (i) it is quick and easy to perform, (ii) it preserves an ultrastructure close to that observed following fixation by perfusion⁶, and (iii) it maintains free megakaryocyte processes and platelets in the sinusoid bloodstream which are otherwise flushed out/lost after perfusion. With this technique it is possible to investigate the entry of megakaryocytes into the sinusoidal circulation and to characterize all the intermediate forms of cytoplasmic processes from which platelets arise⁸. In line with this, it has recently been reported that the large protrusions intravasating from megakaryocytes *in vivo* are structurally distinct from the thin extensions formed by megakaryocytes *in vitro*, with notably a different arrangement of the microtubules⁷. Similarly, we have recently shown that the mechanism governing platelets formation *in vivo* differs from that identified *in vitro*¹⁴.

Important ultrastructural differences are increasingly recognized between *in vitro* cultured and *in vivo* generated native megakaryocytes, underscoring the need for the bone marrow microenvironment for a full megakaryocyte differentiation/maturation. Following combination of bone marrow flushing and fixation by immersion described in this article, conventional transmission electron microscopy still remains an invaluable tool to study megakaryocyte biology and platelet formation, under physiological and pathological conditions.

Disclosures

The authors have no conflicts of interests to declare.

Acknowledgments

The authors wish to thank Fabienne Proamer, Jean-Yves Rinckel, David Hoffmann, Monique Freund for technical assistance. This work was supported by ARMESA (Association de Recherche et Développement en Médecine et Santé Publique), the European Union through the European Regional Development Fund (ERDF) and by Grant ANR-17-CE14-0001-01 to H.d.S.

References

1. Machlus, K. R., Italiano, J. E. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *The Journal of Cell Biology*. **201** (6), 785-796 (2013).
2. Zucker-Franklin, D., Termin, C. S., Cooper, M. C. Structural changes in the megakaryocytes of patients infected with the human immune deficiency virus (HIV-1). *American Journal of Pathology*. **134** (6), 9 (1989).
3. Eckly, A. et al. Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood*. **123** (6), 921-930 (2014).
4. Scandola, C. et al. Use of electron microscopy to study megakaryocytes. *Platelets*. 1-10 (2020).
5. Behnke, O., Forer, A. From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *European Journal of Haematology*. **60** (S61), 3-23 (2009).
6. Eckly, A. et al. Characterization of megakaryocyte development in the native bone marrow environment. *Platelets and Megakaryocytes*. **788**, 175-192 (2012).
7. Brown, E., Carlin, L. M., Nerlov, C., Lo Celso, C., Poole, A. W. Multiple membrane extrusion sites drive megakaryocyte migration into bone marrow blood vessels. *Life Science Alliance*. **1** (2), e201800061 (2018).

8. Eckly, A. et al. Megakaryocytes use in vivo podosome-like structures working collectively to penetrate the endothelial barrier of bone marrow sinusoids. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. jth.15024 (2020).
9. Cramer, E. M. et al. Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand. *Blood*. **89** (7), 2336-2346 (1997).
10. Heijnen, H. F. G., Debili, N., Vainchencker, W., Breton-Gorius, J., Geuze, H. J. Multivesicular Bodies Are an Intermediate Stage in the Formation of Platelet α -Granules. *Blood*. 91 (7) 2313-2325 (1998).
11. Gupta, N., Jadhav, K., Shah, V. Emperipolesis, entosis and cell cannibalism: Demystifying the cloud. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. **21** (1), 92 (2017).
12. Centurione, L. et al. Increased and pathologic emperipolesis of neutrophils within megakaryocytes associated with marrow fibrosis in GATA-1low mice. *Blood*. **104** (12), 3573-3580 (2004).
13. Ellis, S. L. et al. The relationship between bone, hemopoietic stem cells, and vasculature. *Blood*. **118** (6), 1516-1524 (2011).
14. Bornert, A. et al. Cytoskeletal-based mechanisms differently regulate in vivo and in vitro proplatelet formation. *Haematologica*. (2020).



Heparan sulfates are critical regulators of the inhibitory megakaryocyte-platelet receptor G6b-B

Timo Vögtle¹, Sumana Sharma², Jun Mori¹, Zoltan Nagy¹, Daniela Semeniak³, Cyril Scandola⁴, Mitchell J Geer¹, Christopher W Smith¹, Jordan Lane⁵, Scott Pollack⁵, Riitta Lassila^{6,7}, Annukka Jouppila⁸, Alastair J Barr⁹, Derek J Ogg¹⁰, Tina D Howard¹⁰, Helen J McMiken¹⁰, Juli Warwicker¹⁰, Catherine Geh¹⁰, Rachel Rowlinson¹⁰, W Mark Abbott¹⁰, Anita Eckly⁴, Harald Schulze³, Gavin J Wright², Alexandra Mazharian¹, Klaus Fütterer¹¹, Sundaresan Rajesh¹², Michael R Douglas^{13,14,15}, Yotis A Senis^{1,4*}

¹Institute of Cardiovascular Sciences, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom; ²Cell Surface Signalling Laboratory, Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, United Kingdom; ³Institute of Experimental Biomedicine, University Hospital Würzburg, Würzburg, Germany; ⁴Université 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; ⁵Sygnature Discovery Limited, Nottingham, United Kingdom; ⁶Coagulation Disorders Unit, Department of Hematology, Comprehensive Cancer Center, University of Helsinki, Helsinki University Hospital, Helsinki, Finland; ⁷Aplagon Oy, Helsinki, Finland; ⁸Coagulation Disorders Unit, Helsinki University Hospital Research Institute, Helsinki, Finland; ⁹Department of Biomedical Science, Faculty of Science & Technology, University of Westminster, London, United Kingdom; ¹⁰Peak Proteins Limited, Alderley Park, Cheshire, United Kingdom; ¹¹School of Biosciences, College of Life and Environmental Sciences, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom; ¹²Institute of Cancer and Genomic Sciences, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom; ¹³Institute of Inflammation and Ageing, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom; ¹⁴Department of Neurology, Dudley Group NHS Foundation Trust, Dudley, United Kingdom; ¹⁵School of Life and Health Sciences, Aston University, Birmingham, United Kingdom

*For correspondence:
yotis.senis@efs.sante.fr

Competing interest: See
page 37

Funding: See page 38

Received: 14 March 2019

Accepted: 21 August 2019

Published: 22 August 2019

Reviewing editor: Pamela J Bjorkman, California Institute of Technology, United States

© Copyright Vögtle et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Abstract The immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM)-containing receptor G6b-B is critical for platelet production and activation. Loss of G6b-B results in severe macrothrombocytopenia, myelofibrosis and aberrant platelet function in mice and humans. Using a combination of immunohistochemistry, affinity chromatography and proteomics, we identified the extracellular matrix heparan sulfate (HS) proteoglycan perlecan as a G6b-B binding partner. Subsequent *in vitro* biochemical studies and a cell-based genetic screen demonstrated that the interaction is specifically mediated by the HS chains of perlecan. Biophysical analysis revealed that heparin forms a high-affinity complex with G6b-B and mediates dimerization. Using platelets from humans and genetically modified mice, we demonstrate that binding of G6b-B to HS and

multivalent heparin inhibits platelet and megakaryocyte function by inducing downstream signaling via the tyrosine phosphatases Shp1 and Shp2. Our findings provide novel insights into how G6b-B is regulated and contribute to our understanding of the interaction of megakaryocytes and platelets with glycans.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.001>

Introduction

Platelets are highly reactive anucleated cell fragments, which are produced by megakaryocytes (MKs) in the bone marrow, spleen and lungs. In an intact vasculature, platelets circulate in the blood stream for 7–10 days and are finally cleared by the reticulo-endothelial system in the spleen and liver. Upon vascular injury, however, platelets adhere to the exposed vascular extracellular matrix (ECM), become activated and form a hemostatic plug that seals the wound. Platelet activation must be tightly regulated to avoid hyperactivity and indiscriminate vessel occlusion (Bye *et al.*, 2016; Jackson, 2011). The mechanisms that inhibit platelet activation include extrinsic factors, such as endothelial-derived nitric oxide and prostacyclin, and intrinsic factors, such as immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM)-containing receptors (Coxon *et al.*, 2017; Nagy and Smolenski, 2018).

G6b-B is a unique platelet ITIM-containing receptor that is highly expressed in mature MKs and platelets (Coxon *et al.*, 2017; Senis *et al.*, 2007). It is a type I transmembrane protein that consists of a single N-glycosylated immunoglobulin-variable (IgV)-like domain in its extracellular region, a single transmembrane domain and a cytoplasmic tail containing an ITIM and an immunoreceptor tyrosine-based switch motif (ITSM). The central tyrosine residues embedded in the consensus sequences of the ITIM ([I/V/L]xYxx[V/L]) and ITSM ([T]xYxx[V/I]) become phosphorylated by Src family kinases (SFKs) and subsequently act as docking sites for the Src homology 2 (SH2) domain-containing protein-tyrosine phosphatases (Shp)1 and 2 (Mazharian *et al.*, 2012; Senis *et al.*, 2007). The canonical mode of action of ITIM-containing receptors is to position these phosphatases, as well as the SH2 domain-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase 1 (SHIP1) in close proximity to ITAM-containing receptors, allowing them to dephosphorylate key components of the ITAM signaling pathway and to attenuate activation signals. The inhibitory function of G6b-B has been demonstrated in a heterologous cell system, by antibody-mediated crosslinking of the receptor in platelets and G6b-B knockout (KO) mouse models (Mazharian *et al.*, 2012; Mori *et al.*, 2008; Newland *et al.*, 2007). Findings from these mice demonstrated that the function of G6b-B goes beyond inhibiting signaling from ITAM-containing receptors (Mazharian *et al.*, 2013; Mazharian *et al.*, 2012). These mice develop a severe macrothrombocytopenia, myelofibrosis, and aberrant megakaryocyte and platelet function, establishing G6b-B as a critical regulator of platelet activation and production. This phenotype was also observed in a G6b-B loss-of-function mouse model (*Mpig6b*^{diYF}) in which the tyrosine residues within the ITIM and ITSM were mutated to phenylalanine residues, abrogating the binding of Shp1 and Shp2 to G6b-B and downstream signaling (Geer *et al.*, 2018). Moreover, expression of human G6b-B in mouse platelets rescued the phenotype of G6b-B-deficient mice, demonstrating that human and mouse G6b-B exert the same physiological functions (Hofmann *et al.*, 2018). Importantly, null and loss-of-function mutations in human G6b-B have been reported to recapitulate key features of the *Mpig6b* KO and loss-of-function mouse phenotypes, including a severe macrothrombocytopenia, MK clusters in the bone marrow and myelofibrosis (Hofmann *et al.*, 2018; Melhem *et al.*, 2016). Despite the vital role of G6b-B in regulating platelet production and function, its physiological ligand was not known. Although a previous study demonstrated that G6b-B binds to the glycosaminoglycan (GAG) heparin, the functional significance of this interaction was not known (de Vet *et al.*, 2005).

Proteoglycans comprise a heterogeneous family of macromolecules, consisting of a core protein and associated unbranched GAG side-chains. Heparan sulfates (HS) are a specific subgroup of GAGs, defined by their basic disaccharide unit. They are structurally related to heparin, which is produced as a macromolecular proteoglycan by tissue-resident mast cells (Lassila *et al.*, 1997) and which, following chemical or enzymatic processing, serves as an anti-coagulant (Chandarajoti *et al.*, 2016; Meneghetti *et al.*, 2015). One of the best studied and abundant HS proteoglycans is perlecan, which is synthesized and secreted by endothelial and smooth muscle cells

into the vessel wall. It is comprised of a large 400-kDa core protein and has three HS chains attached to its N-terminus. A number of proteins reportedly interact with the HS chains and protein core of perlecan, among them are structural components of the ECM, including laminin, collagen IV and fibronectin, and fibroblast growth factor-2 (Nugent *et al.*, 2000; Whitelock *et al.*, 2008). Of note, the proteolytically released C-terminal fragment of perlecan, called endorepellin, binds to integrin $\alpha 2\beta 1$ and enhances collagen-mediated platelet activation (Bix *et al.*, 2007). Perlecan has also been shown to exert anti-thrombotic properties in an ovine vascular graft model through its HS side-chains, although the underlying mechanism has not been defined (Lord *et al.*, 2009).

In this study, we identified the physiological ligand of G6b-B, the molecular basis of the G6b-B ligand interactions and the mechanism underlying physiological effects. Our findings demonstrate that G6b-B binds the HS chains of perlecan, as well as to heparin, eliciting functional responses in MKs and platelets. Moreover, we also show that a cross-linked, semisynthetic form of heparin, called anti-platelet anti-coagulant (APAC) (Lassila and Jouppila, 2014), beyond inhibiting collagen-mediated platelet aggregation, induces robust phosphorylation and downstream signaling of G6b-B. Collectively, these results reveal that HSs regulate G6b-B signaling and function, providing a novel mechanism by which MK and platelet function is regulated.

Results

Identification of perlecan as a ligand of G6b-B

To identify the tissue expressing the physiological ligand of G6b-B, we generated a recombinant mouse G6b-B Fc-fusion protein (mG6b-B-Fc), consisting of the murine G6b-B ectodomain and the human IgG-Fc tail (to mediate dimer formation), which we used to stain frozen mouse tissue sections. We consistently observed prominent staining in large vessels, including the vena cava and aorta, and also in smaller vessels in the liver and spleen, that were not observed with the negative control (IgG-Fc) (Figure 1), suggesting the presence of G6b-B ligand in vessel walls. The highly vascularized bone marrow sections showed a more diffuse staining, indicative of the presence of the ligand in the bone marrow ECM (Figure 1).

Because of the strong signals and easy accessibility of the vena cava, we incubated vena cava homogenates with mG6b-B-Fc and protein G sepharose beads to precipitate and identify G6b-B binding partners. SDS-PAGE and colloidal coomassie staining revealed bands of high molecular weight that were absent in the negative control (IgG-Fc pulldown, Figure 1—figure supplement 3). Bands were excised and proteins identified by mass spectrometry, revealing basal membrane-specific HS proteoglycan (HSPG) core protein or perlecan as the most abundant protein specifically pulled-down with mG6b-B-Fc (Table 1).

The interaction with perlecan was verified using an *in vitro* binding assay, which measured the binding of soluble mG6b-B-Fc to immobilized molecules. mG6b-B-Fc bound robustly to perlecan, but not to bovine serum albumin (BSA) (control) or other ECM molecules, including collagen I and IV, various forms of laminin (111, 411, 421, 511 and 521), fibronectin or the related and recombinantly expressed HSPGs syndecan-2 or agrin (Figure 2A). Hence, the laminin and collagen identified by G6b-B pulldown and mass spectrometry (Table 1) most probably represented perlecan-associated proteins (Battaglia *et al.*, 1992) rather than direct binding partners of G6b-B. Human G6b-B-Fc (huG6b-B-Fc) showed binding characteristics similar to those of mG6b-B-Fc (Figure 2A).

Treatment of perlecan with the enzyme heparinase III, which removes the HS side-chains, significantly reduced G6b-B binding to immobilized perlecan (Figure 2B), indicating that G6b-B binds to the HS side-chains rather than the protein core. This observation was further supported by a competition assay, in which the addition of soluble HS inhibited the binding of G6b-B to immobilized perlecan (Figure 2C). Of note, unfractionated heparin, which is closely related to HS, also interfered with G6b-B binding to perlecan and streptavidin-immobilized biotin-conjugated heparin and also bound directly to G6b-B-Fc (Figure 2A).

To gain further insights into the structural requirements of the G6b-B–ligand interaction, we tested heparin oligomers of different lengths (4, 8, 12 and 20 saccharide units, degree of polymerization (dp)4, dp8, dp12 and dp20, respectively) and selectively desulfated heparin molecules for their binding to G6b-B. In a competition assay, only oligomers of at least eight saccharides were able to block binding of G6b-B to heparin-biotin partially, suggesting that this is the minimum length

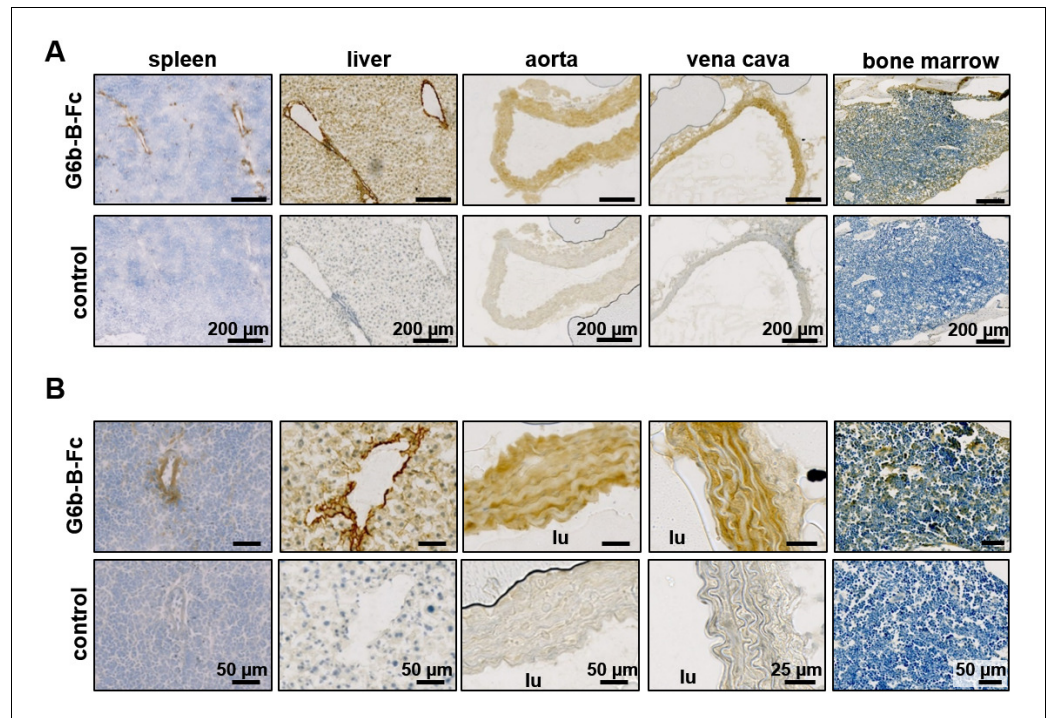


Figure 1. Prominent binding of mG6b-B-Fc to the vessel wall. Immunohistochemistry staining of frozen mouse tissue sections with mG6b-B-Fc or human IgG-Fc fragments (control). Bound protein was visualized using a secondary anti-human-Fc-HRP antibody and DAB substrate, prior to counterstaining with hematoxylin. The images were captured by a Zeiss Axio Scan.Z1 slidescanner, and images were exported using the Zeiss Zen software. (A) Overview and (B) zoomed-in images for the indicated tissues. lu, vessel lumen. Larger overview sections of the tissues are shown in **Figure 1—figure supplements 1, 2**.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.002>

The following figure supplements are available for figure 1:

Figure supplement 1. Overview sections of tissues stained with mG6b-B-Fc or negative control.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.003>

Figure supplement 2. Overview sections of tissues stained with mG6b-B-Fc or negative control.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.004>

Figure supplement 3. Pull-down of G6b-B binding partners from vena cava lysates.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.005>

required for this interaction (**Figure 2—figure supplement 1A**). In addition, high sulfation of the glycan was found to be important for G6b-B binding, as a loss of occupancy of one sulfation site resulted in a significant drop in the ability of the oligomer to block G6b-B binding to native heparin (**Figure 2—figure supplement 1B**).

As the binding assay results suggested that the G6b-B ligand was primarily composed of HS glycans, we opted to confirm and extend these findings using a genome-scale cell-based CRISPR KO screening approach to identify all of the genes that are required for the synthesis and cell surface display of the G6b-B ligand (**Sharma et al., 2018**). We observed that a highly avid recombinant G6b-B molecule, consisting of the entire ectodomain of biotinylated human G6b-B clustered around phycoerythrin (PE)-conjugated streptavidin, robustly stained several human cell lines, providing the basis for a cellular genetic screen (**Figure 3A**). A genome-wide mutant cell library was generated by transducing Cas9-expressing HEK293 cells with a library of lentiviruses, each encoding a single gRNA from a pool of 90,709 individual gRNAs targeting 18,009 human genes (**Sharma et al., 2018**). Transduced cells that had lost the ability to bind to the recombinant protein were isolated using fluorescent-activated cell sorting, and genes that are required for cell surface binding of G6b-B were identified by comparing the relative abundance of gRNAs in the sorted versus unsorted control

Table 1. List of proteins immunoprecipitated with mG6b-B-Fc from vena cava lysates

Accession number	Name	Peptides	Protein score	Protein score negative control	FE
E9PZ16	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein (perlecan)	131	607.22	n.d.	
E9QPE7	<i>Myosin-11</i>	103	468.02	719.71	0.7
F8VQJ3	Laminin subunit gamma-1	75	434.43	9.66	45.0
Q5SX39	<i>Myosin-4</i>	80	328.62	587.14	0.6
Q8VDD5	<i>Myosin-9</i>	81	318.18	513.68	0.6
P97927	Laminin subunit alpha-4	56	285.20	n.d.	
Q61292	Laminin subunit beta-2	63	262.37	n.d.	
B2RWX0	<i>Myosin, heavy polypeptide 1, skeletal muscle, adult</i>	61	244.66	446.14	0.5
P02469	Laminin subunit beta-1	57	236.87	n.d.	
J3QQ16	Protein Col6a3	61	232.99	14.76	15.8
G3UW82	<i>MCG140437, isoform CRA_d</i>	54	214.75	378.87	0.6
B7FAU9	<i>Filamin, alpha</i>	58	202.67	139.51	1.5
Q3UHL6	Putative uncharacterized protein — fibronectin	48	192.76	n.d.	
Q9JKF1	<i>Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1</i>	31	107.79	68.57	1.6
M0QWP1	Agrin	21	84.47	n.d.	
P19096	Fatty acid synthase	27	74.68	23.81	3.1
Q61001	Laminin subunit alpha-5	23	73.24	n.d.	
E9QPX1	Collagen alpha-1(XVIII) chain	16	59.16	n.d.	
A2AJY2	Collagen alpha-1(XV) chain	14	53.53	n.d.	
B7ZNH7	Collagen alpha-1(XIV) chain	15	43.27	3.09	14.0
P26039	<i>Talin-1</i>	11	42.29	29.93	1.4

Fold enrichment (FE)=score G6b-B-FC precipitation/score negative control; n.d. = not detectable. Proteins that are prominently present in the negative control (FE < 2) are shown in italic. The protein score was calculated using the SEQUEST HT search algorithm and is the sum of all peptide Xcorr values above the specified score threshold (0.8 + peptide_charge × peptide_relevance_factor where peptide_relevance_factor is a parameter with a default value of 0.4). The full data set, including the mass spectrometry result for the respective band of a G6b-B-FC only sample, is found in **Table 1—source data 1–3**. A picture of a gel and the bands excised for mass-spectrometric analysis are shown in **Figure 1—figure supplement 3**.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.006>

The following source data is available for Table 1:

Source data 1. Mass spectrometry results for proteins precipitated from vena cava lysates with mG6b-B-Fc.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.007>

Source data 2. Mass spectrometry results for proteins precipitated from vena cava lysates with Fc control protein.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.008>

Source data 3. Mass spectrometry results for the proteins detected at the respective height after loading mG6b-B-Fc only (no vena cava lysate).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.009>

populations (Li et al., 2014). Using this strategy, we unambiguously identified many genes that are required for HS biosynthesis, beginning with the generation of the tetrasaccharide linkage on the serine residue of the protein backbone (B3GAT3, XYLT2, B4GALT7), the commitment towards the HS pathway (EXTL3), HS chain polymerization (EXT1/2), and HS chain modification (NDST1, HS2ST1) (Figure 3B). Of particular note, genes encoding the enzymes chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1 and 2 (CSGALNACT1/2), which are essential for the

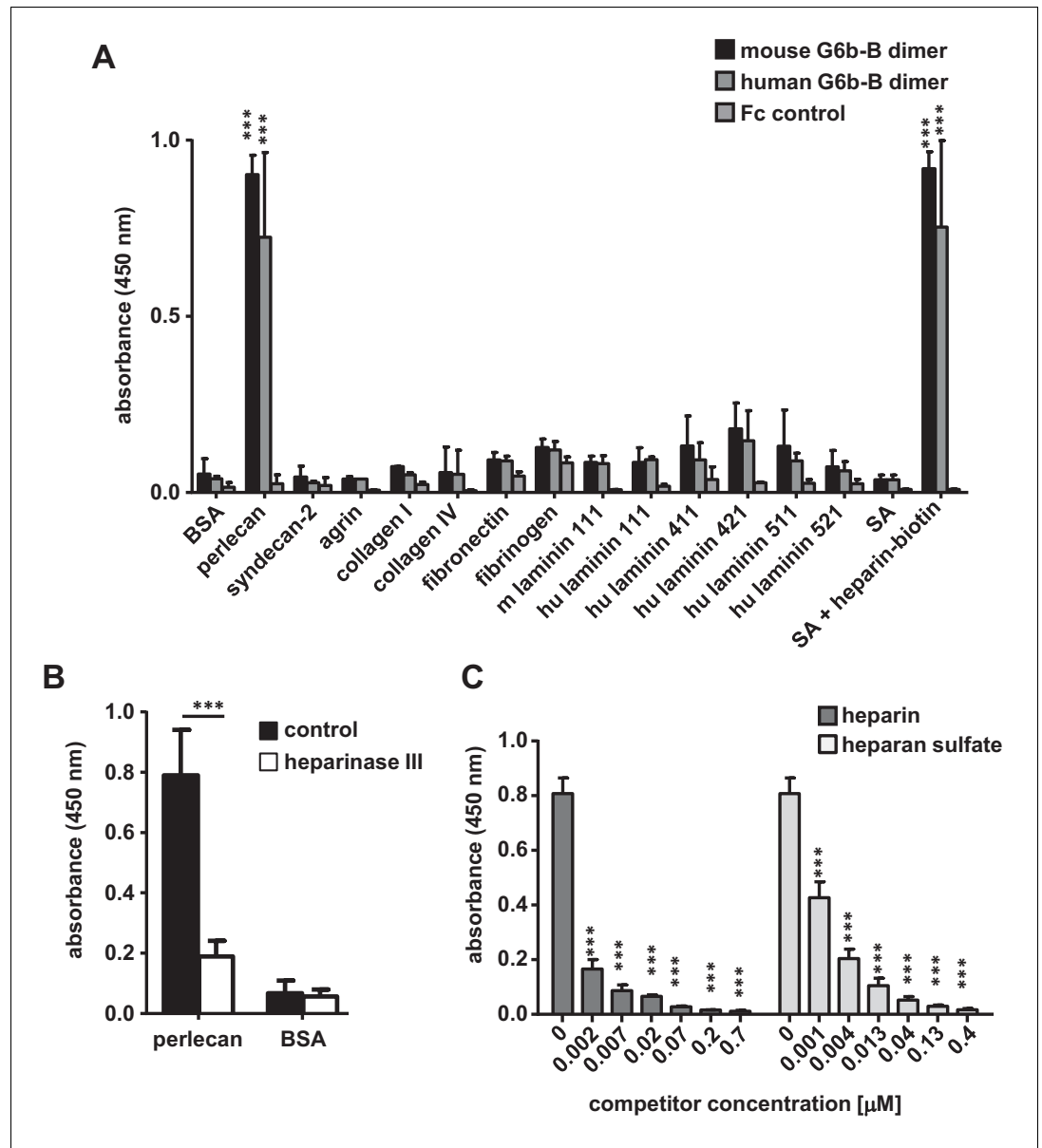


Figure 2. G6b-B-Fc binds to heparan sulfate side-chains of perlecan. (A) 96-well plates were coated with the indicated substrates (5 μg/ml) and incubated with mouse G6b-B-Fc (10 μg/ml), human G6b-B-Fc (30 μg/ml) or Fc-control (10 μg/ml). Bound protein was detected with an anti-human-Fc-HRP antibody and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate. n = 2–4; SA, streptavidin. (B) Perlecan and bovine serum albumin (BSA) were treated or not with heparinase III (5 mU/ml) prior to blocking, and mG6b-B-Fc binding was measured. n = 4. (C) mG6b-B binding to immobilized perlecan was measured in the presence of the indicated concentrations of heparin and heparan sulfate. n = 3. P-values were calculated using ordinary one-way ANOVA with Dunnett's post-hoc test and asterisks denote statistical significance compared to the respective control. ***, p<0.001. Source files of all binding assays are available in [Figure 2—source data 1](#).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.010>

The following source data and figure supplement are available for figure 2:

Source data 1. Source data for graphs shown in [Figure 2A–C](#).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.012>

Figure supplement 1. Loss of heparin sulfation impairs interaction with G6b-B.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.011>

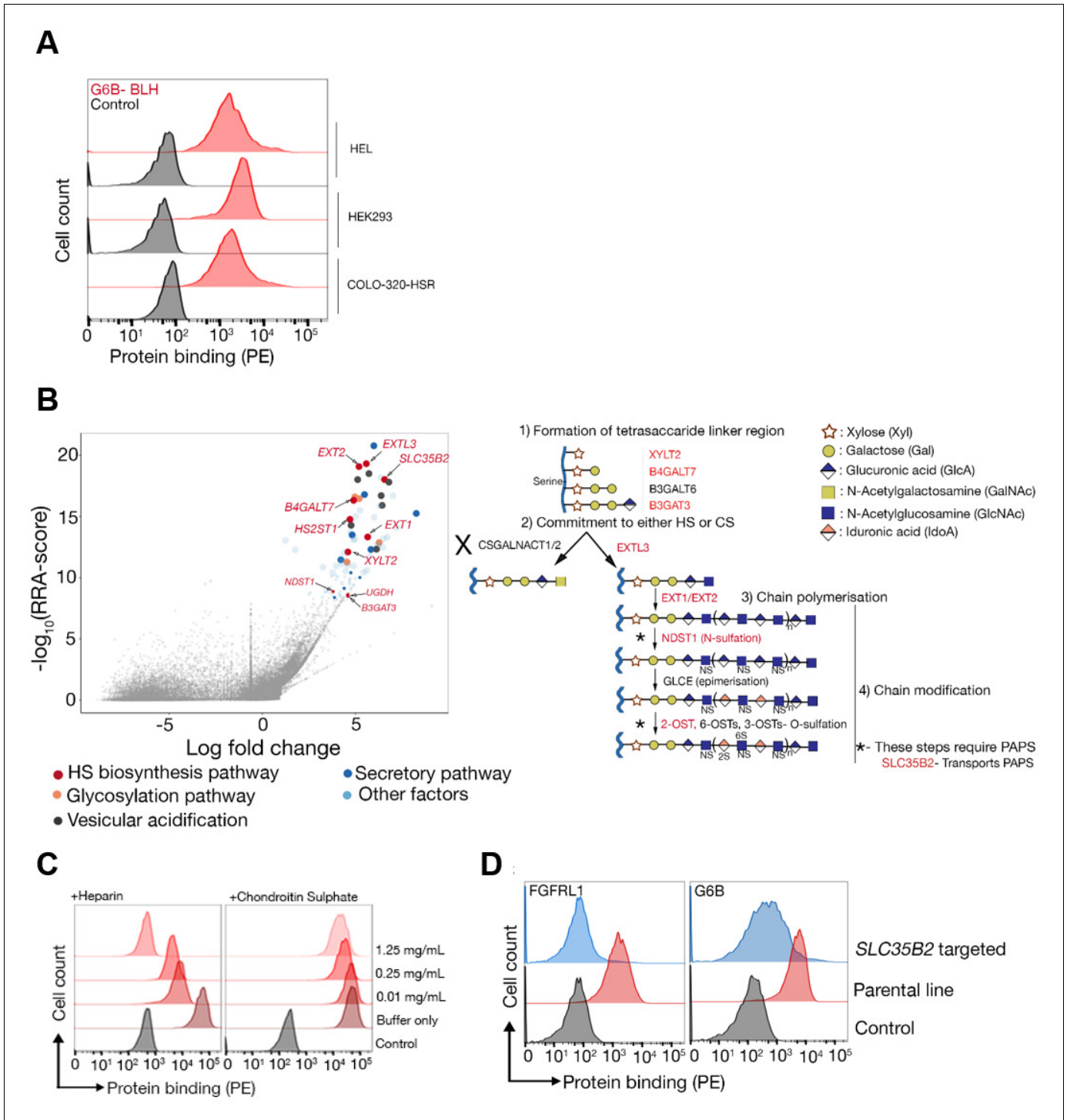


Figure 3. The heparan sulfate biosynthesis pathway is required for G6b-B binding to HEK293 cells. (A) Recombinant G6b-B, produced as a monomeric biotinylated protein and conjugated to streptavidin-PE to generate an avid probe, binds to HEL, HEK293 and COLO-320-HSR cells. (B) A genome-wide loss-of-function approach identifies the HS biosynthesis pathway as the factor required to mediate the binding of recombinant G6b-B to HEK293 cells (left panel). X- and y-axis represent the log-fold-change (LFC) and robust rank aggregation (RRA) score calculated using the MAGeCK software, respectively. Circles represent individual genes and sizes represent the false-discovery rate (FDR): large circle = FDR < 1%, small circle = 1% < FDR < 5%. Genes with FDR < 5% are color coded according to their functional annotation and genes corresponding to the HS biosynthesis pathway are additionally named. The HS biosynthesis pathway is depicted in the right panel with the genes identified in the loss-of-function approach highlighted. Similar results were obtained in HEL cells (not shown). (C) G6b-B binding to HEK293 cells was measured by flow cytometry in the presence or absence of heparin or chondroitin sulfate. Figure 3 continued on next page

Figure 3 continued

of the indicated concentration of heparin or chondroitin sulfate. One representative out of three experiments is shown. (D) G6b-B loses its binding to cell lines when *SLC35B2*, encoding a transporter required for the sulfation of glycosaminoglycans (GAGs), is targeted. To ensure that the KO cells lack GAGs, a known HS binding protein, FGFR1, is used as a control that confirms the loss of binding on these cell lines. Source data for the genomic screens in HEK293 and HEL cells are available in **Figure 3—source data files 1–2** and **3–4**, respectively.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.013>

The following source data is available for figure 3:

Source data 1. Raw read counts from the screen carried out in HEK293 cells.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.014>

Source data 2. MAGeCK output for gene-wise ranking from the screen carried out in HEK293 cells.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.015>

Source data 3. Raw read counts from the screen carried out in HEL cells.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.016>

Source data 4. MAGeCK output for gene-wise ranking from the screen carried out in HEL cells.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.017>

commitment towards the biosynthesis of chondroitin sulfate chains, were not identified, demonstrating that G6b-B binding to HEK293 cells is mediated by HS, but not by chondroitin sulfate (**Figure 3B**). Moreover, the addition of heparin, but not chondroitin sulfate, inhibited G6b-B binding to HEK293 cells (**Figure 3C**). We also identified *SLC35B2* (Solute Carrier Family 35 Member B2), a gene encoding a transporter protein that translocates 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate from the cytosol into the Golgi apparatus, where it is used as a sulfate donor for the sulfation of glycoproteins, proteoglycans, and glycolipids. We validated the involvement of sulfated HSs in mediating G6b-B binding to cells by individually targeting *SLC35B2* and were able to demonstrate that this led to a loss of G6b-B binding relative to the parental cell line (**Figure 3D**). Together, this genetic screen provides further evidence that the physiological ligand of G6b-B is negatively charged HS, corroborating our *in vitro* binding data.

Molecular basis of G6b-B interaction with the HS side-chains of perlecan

The extracellular domain of G6b-B is enriched in positively charged residues, especially arginines (12 in 125 amino acids; 9.6% vs 5.6% average frequency in mammalian membrane proteins [*Gaur, 2014*]), which are known to mediate strong binding to heparin (*Margalit et al., 1993*). Prior to obtaining the crystal structure, we generated a structural model of G6b-B using template-based tertiary structure prediction (RaptorX Structure Prediction server) and used this model to aid in the identification of candidate residues for mutagenesis. Examination of the model showed four basic residues (Lys54, Lys58, Arg60 and Arg61) in close spatial proximity to each other on a solvent-exposed loop. We tested whether these amino acids are involved in heparin binding by generating a mutant G6b-B (K54D, K58D, R60E, R61E; **Figure 4—figure supplement 1A**) and by comparing heparin binding to WT G6b-B in transiently transfected CHO cells. An anti-G6b-B monoclonal antibody demonstrated a robust cell surface expression of mutant G6b-B that was comparable to that of WT G6b-B, suggesting that the quadruple mutation did not disrupt protein folding or expression (**Figure 4—figure supplement 1B**). Cells expressing WT G6b-B showed an increase in heparin binding compared to that in non-transfected cells, whereas the cells expressing mutant G6b-B showed impaired binding when compared to WT G6b-B expressing cells, demonstrating that these amino acids (or a subset thereof) are involved in ligand binding (**Figure 4—figure supplement 1C**).

The crystal structure of the G6b-B extracellular domain (ECD)–dp12–Fab complex

Subsequent to the tertiary structure prediction, we were able to generate crystals of the ternary complex of the ectodomain of G6b-B bound to the heparin oligosaccharide dp12, scaffolded by a G6b-B-specific Fab fragment, and we determined the structure of this complex by X-ray crystallography to 3.1 Å resolution (**Figure 4** and **Table 2**). The construct that was used was N32D, S67A, S68A, S69A, T71A. The N32D mutation was made to remove the single potential N-linked glycosylation

site. Intact mass spectrometry also revealed that after having made the N32D mutation, the measured mass of the protein was 948 Da greater than expected, consistent with O-glycosylation. Subsequent analysis identified five Ser and Thr residues as O-glycosylation sites, of which four were mutated to Ala in successful crystallization experiments.

The solved complex encompasses six protein subunits, a dimer of G6b-B and two Fab fragments. As expected for a Fab-scaffolded structure, crystal packing contacts occur predominantly between the Fab fragment subunits (**Figure 4—figure supplement 2A**), but sparse direct contacts between symmetry-related G6b-B subunits also occur (**Figure 4—figure supplement 2B**).

Confirming the fold of the predicted model, the ectodomain of G6b-B forms an immunoglobulin-like fold of a topology closely resembling the structure of a variable immunoglobulin (Ig) domain (**Figure 4C**) (**Brändén and Tooze, 2009**). A disulfide bond between cysteine residues 35 and 108 (strands B and F, respectively) stabilizes the immunoglobulin (Ig) fold (**Figure 4C**). The backbone does not form the canonical strand C'', and only a very short strand D. In a canonical Ig domain, strand A is part of the sheet formed by strands B–E–D, but in the case of G6b-B, it is part of the opposite sheet (strands C'–C–F–G). The two G6b-B subunits (peptide chains E and F in the coordinate set) superimpose closely relative to the core β -sandwich structure, but divert markedly from each other in the loop connecting strands C' and D (residues 66 to 81; **Figure 4C**). This loop includes several putative O-glycosylation sites (**Figure 4D**), which were mutated to Ala to ensure homogeneous glycosylation of the protein. However, the O-linked glycosylation site Thr73 was retained, and electron density shows the presence of three saccharides attached to Thr73 in both peptide chains (**Figure 4—figure supplement 3**). Although the electron density (resolution 3.1 Å) does not allow the unequivocal identification of the saccharides, the groups could be modeled as galactose, α -N-acetyl-D-galactosamine and O-sialic acid, respectively. These glycosyl groups are well separated from the heparin oligosaccharide.

The ectodomain of G6b-B assembles into an apparent dimer with a pseudo two-fold symmetry oriented perpendicular to the extended β -sheet that forms the heparin binding site (**Figure 4C**). Dimer formation of G6b-B is driven by the heparin ligand, as demonstrated by size exclusion chromatography (**Figure 5**). Although G6b ECD was eluted at approximately 12.9 kDa, matching the molecular weight of the monomeric protein, the addition of the heparin oligomer dp12 (3.6 kDa) resulted in a complex of around 30.8 kDa, corresponding to the weight of two G6b-B molecules and one dp12 molecule (**Figure 5**).

The interface between chains E and F buries approximately 800 Å² of solvent accessible surface area. In line with the modest surface area buried between the two subunits, the interface analysis using the PISA software does not predict a stable complex (**Krissinel and Henrick, 2007**), consistent with the observation that ectodomain dimerization is induced by the heparin ligand. Non-covalent contacts between the two chains consist almost entirely of van der Waals (vdW) and hydrophobic interactions, with Trp65^F and Pro62^F positioned centrally in the interface, contacting Pro62^E and Arg61^E, while Trp65^E forms vdW contacts with Val77^F. There are very few H-bond interactions (Ser57^E-O γ – Ala66^F-O/Ala68^F-N; Lys58^E-N ζ – Arg43^F-O) across the interface, and notably the central β -sheet (strands C'–C–F–G–A) is not continuous in that it lacks main chain – main chain hydrogen bonds between the C' strands of opposing protomers (**Figure 4B**). Nevertheless, dimerization creates a deep cleft, into which the heparin ligand inserts (**Figure 6A**). Crystallization involved a dodeca-saccharide, of which eight residues are visible in the electron density map (**Figure 6—figure supplement 1**), with the central residues 4 and 5 representing sulfated L-iduronic acid (IDS) and D-glucosamine (SGN), respectively. Although the ligand-binding cleft provides partial charge complementarity to the sulfate groups of the heparin ligand (**Figure 6A**), perhaps surprisingly, only one sulfate group (residue SGN5) forms ionic interactions with basic side-chains (SGN5-O2S – Arg60^F-N ϵ 3.3 Å, SGN5-O3S – Lys109^F-N ζ 3.2 Å, where the superscript refers to the chain ID; **Figure 6B,C**). The other eight polar contacts (within a distance cut-off of 4 Å) involving sulfate groups are with backbone amides (Arg60^E, Glu113^E, His112^E; 2.8–3.3 Å) rather than side-chains, while nine residues, including Lys109^E, form vdW interactions with the ligand (**Figure 6B,C**). There is exquisite shape complementarity between the heparin and the surface of the G6b-B dimer, even though the S-shaped ligand only partially fills the ligand-binding cleft.

We next measured the binding affinities of G6b-B for the various ligands using surface plasmon resonance (SPR). The human G6b-B-Fc-His6 homodimer and the human G6b-B-Fc-His6/Fc-StreptagII heterodimer were used as dimeric and monomeric G6b-B molecules, respectively. It is important to

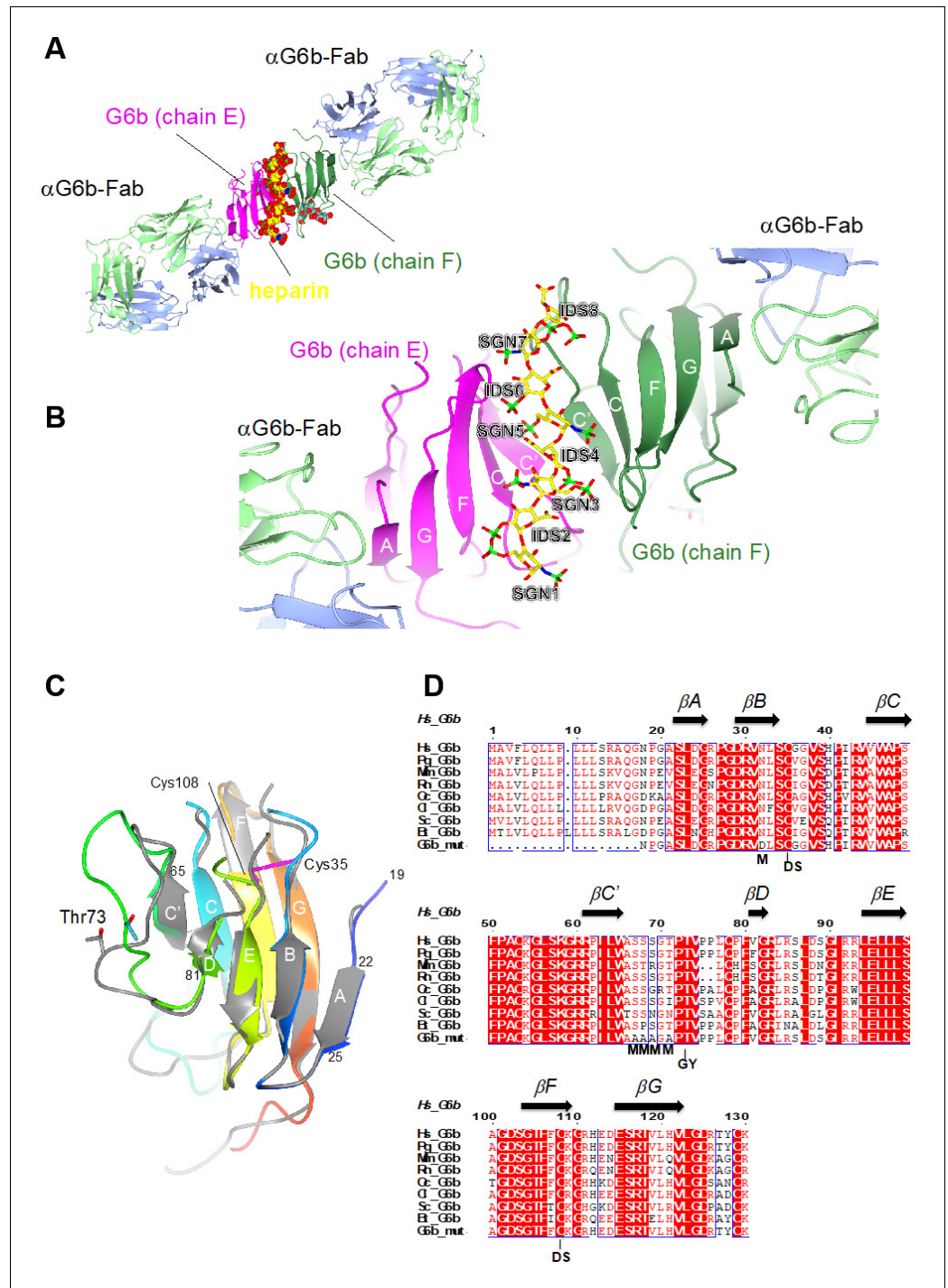


Figure 4. Ribbon representation of the ternary complex of the extracellular domain (ECD) of human G6b-B bound to heparin and the Fab fragment of a G6b-B-specific antibody. (A) Overview of the structure, with G6b-B colored in magenta and dark green, heparin shown as spheres, and the Fab fragment chains in light green/light blue, respectively. The assembly represents the asymmetric unit of the crystal lattice (space group $C2$). (B) Close-up view illustrating the position of the heparin ligand relative to the secondary structure of the G6b-B dimer. Heparin residues (shown as sticks) are sulfated D-glucosamine (SGN) and L-iduronic acid (IDS). The color coding of heparin atoms is: C, yellow; O, red; N, blue; and S, green. β -strands in G6b-B are labeled according to the canonical Ig-fold. (C) Superposition of chains F (various colors) and E (gray) of the G6b-B ECD. Strands are labeled according to the canonical β -sandwich topology of the variable Ig domain. The fold of G6b-B deviates from the canonical Ig fold. *Figure 4 continued on next page*

Figure 4 continued

fold in missing strand C'', and as strand A is part of the β -sheet of strands B, E and D. Chain F is color ramped from blue (N-terminus) to red (C-terminus), and the position of the disulfide bond (Cys35–Cys108) is indicated by sticks in magenta. The glycosylation site Thr73 is shown (sticks) with glycosyl groups omitted from the view. (D) Multiple sequence alignment of G6b-B orthologs across mammalian species with secondary structure elements indicated above the sequence. Residue numbers refer to the sequence of human G6b. Conserved residues are boxed, with identities shown as white letters on a red background. Species abbreviations are: Hs, *Homo sapiens*; Pg, *Pan troglodytes* (chimpanzee); Mm, *Mus musculus* (mouse); Rn, *Rattus norvegicus* (rat); Oc, *Oryctolagus cuniculus* (rabbit); Cl, *Canis lupus familiaris* (dog); Sc, *Sus scrofa* (wild boar); and Bt, *Bos taurus* (cattle). G6b_mut is the sequence of the recombinant human G6b-B ECD used in crystallization, with mutations of the five putative glycosylation sites (marked with M). GY indicates the retained O-glycosylation site and DS indicates the disulfide cysteine residues.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.018>

The following figure supplements are available for figure 4:

Figure supplement 1. Mutations in G6b-B abolish heparin binding.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.019>

Figure supplement 2. Representation of the crystal lattice.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.020>

Figure supplement 3. Unbiased σ_A -weighted difference density map demonstrating the presence of the O-linked glycosyl groups at Thr73.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.021>

note that SPR measures the overall avidity rather than the direct binding affinity of the interactions, factoring in the effects of the multivalent nature of both the receptor (bivalent dimeric form) and the ligands themselves. In the configuration with chip-immobilized G6b-B molecules, heparin bound to both monomeric and dimeric G6b-B with high affinity (low nanomolar range). Similar values were obtained for fractionated (9 kDa) HS and the 12 saccharide heparin oligomer dp12. The binding affinity of perlecan was 366-fold weaker than that of heparin, in the low micromolar range (**Table 3** and **Figure 7A**). The reverse configuration was also tested, in which ligands were biotinylated and immobilized on streptavidin chips. The binding avidity of dimeric G6b-B to perlecan, fractionated HS and heparin was comparable to that measured in the ligand-immobilized configuration (**Table 3** and **Figure 7A**). Interestingly, in the ligand-immobilized configuration, differences in the binding of monomeric and dimeric G6b-B were observed for both heparin and fractionated HS, with the binding of the monomer being approximately 100-fold weaker than that of the dimer (**Table 3** and **Figure 7B**). The apparent decrease in the potency of monomer in the ligand-immobilized configuration versus that in the G6b-B-immobilized configuration is likely to be the result of the ligands themselves being multi-site molecules that are able to bind several sites on the immobilized G6b-B protein surface. Even when the monomeric form of G6b-B is immobilized in the standard assay configuration, the ligands' size and avidity allows them to bind multiple immobilized monomers simultaneously. When the configuration is reversed and the monomeric G6b-B is passed over the flow cell, only a weaker one-to-one binding mode is observed. More efficient binding of the dimeric form in this assay configuration correlates with our crystallography data showing that ligand binding induces dimer formation.

Biological effects of perlecan, heparin and HS on platelets and MKs

Having established HS as ligand for G6b-B, we examined the effect of surface-bound ligand on platelet function, using an in vitro platelet adhesion assay, in which human platelets were incubated on different substrates and their adhesion was quantified colorimetrically. Platelets bound to fibrinogen, as expected, but failed to adhere to perlecan (**Figure 8A**). However, removal of the HS side-chains by heparinase III treatment resulted in robust adhesion to perlecan. This adhesion might be mediated by interaction of integrin $\alpha_2\beta_1$ with the perlecan protein core (**Bix et al., 2007**), but the contribution of other receptors cannot be excluded. Importantly, perlecan also inhibited the adhesion to fibrinogen and collagen when immobilized together with these substrates. Again, this anti-adhesive effect was abolished upon treatment with heparinase III (**Figure 8A**). These results suggest that the HS side-chains of perlecan negatively regulate platelet adhesion.

Table 2. Crystallographic data collection and refinement statistics for the G6b-B ECD-dp12-Fab complex.**X-ray diffraction data**

Beamline	I03, Diamond Light Source
Wavelength (Å)	0.97624
Space group	C2
Cell parameters (Å)	183.8, 72.34, 131.0, $\beta = 124.5^\circ$
Complexes per asymmetric unit	1
Resolution range (Å)	65.27–3.13
High resolution shell (Å)	3.18–3.13
Rmerge (%) [*]	17.0 (146.6)
Total observations, unique reflections	74,255/24,543
I/ σ (I) [*]	4.0 (0.7)
Completeness (%) [*]	97.2 (98.2)
Multiplicity [*]	3.0 (3.1)
CC _{1/2} ^{*, †}	0.991 (0.348)
Refinement	
Resolution range	63.1–3.13
Unique reflections	24,543
R _{cryst} , R _{free} (%)	22.6, 26.0
Number of non-H atoms	7852
RMSD bonds (Å)	0.01
RMSD angles (°)	1.18
B-factors	
Wilson (Å ²)	77.5
Average overall (Å ²)	84.7
RMSD B-factors (Å ²)	5.737
Ramachandran statistics [‡]	
Favored regions (%)	91.2
Allowed regions (%)	8.3
Disallowed (%)	0.5

^{*} parentheses refer to the high resolution shell.

[†] as defined in **Karplus and Diederichs (2012)**.

[‡] calculated using molprobity (**Williams et al., 2018**).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.022>

To determine whether this inhibitory effect of perlecan on platelet adhesion is mediated via G6b-B, we performed platelet adhesion experiments with platelets from WT and G6b-B knockout (*Mpig6b*^{-/-}) mice (**Figure 8B**). WT mouse platelets exhibited adhesion characteristics that were similar to those of human platelets, with the exception that they adhered weakly to heparinase III-treated perlecan (**Figure 8B**). Importantly, co-coating of fibrinogen together with perlecan reduced the adhesion of WT but not of G6b^{-/-} platelets, resulting in enhanced adhesion of *Mpig6b*^{-/-} platelets under this condition. Pre-treatment of perlecan with heparinase III abolished this difference (**Figure 8B**). Adhesion of WT platelets to collagen was inhibited by perlecan in a similar manner as human platelets (data not shown). Platelets from *Mpig6b*^{-/-} could not be meaningfully evaluated on collagen, because of the severe reduction in GPVI surface expression (**Mazharian et al., 2012**). Collectively, these findings demonstrate that the G6b-B-HS interaction inhibited the adhesion of human platelets to the perlecan protein core, collagen and fibrinogen, suggesting an inhibitory effect on integrin and GPVI signaling.

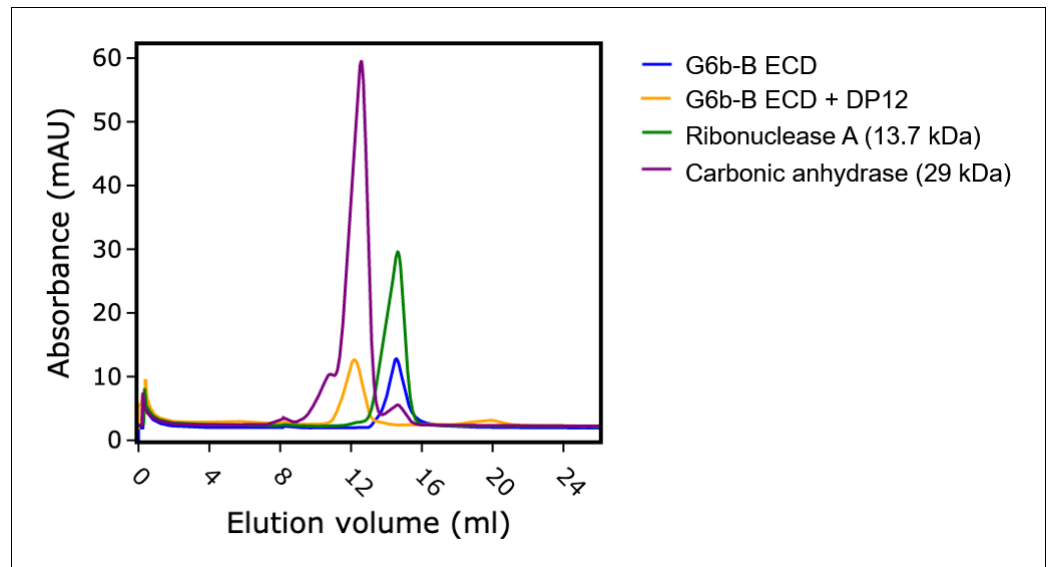


Figure 5. Heparin induces G6b-B dimer formation. Size exclusion chromatography of G6b-B ECD. Protein was either analyzed immediately or incubated at 4°C for 1.5 hr in the presence of dp12 before analysis on a Superdex 75 10/300 GL column. Molecular weights were estimated using a calibration curve. Values of 30.8 kDa and 12.9 kDa were obtained for G6b-B ECD in the presence and absence of dp12 (approx. 3.6 kDa), respectively. Ribonuclease A (13.7 kDa) and carbonic anhydrase (29 kDa) are shown for comparison.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.023>

We next investigated the morphological changes in platelets that are adherent to perlecan by microscopy. In contrast to human platelets adhering to fibrinogen, which exhibited characteristic spreading and actin stress fiber formation, platelets adhering to perlecan were small in size and did not spread. The removal of the HS chains of perlecan resulted in a modest increase in size, although the platelets were still much smaller than the platelets adhering to fibrinogen alone (**Figure 8C**).

Mouse WT platelets, like human platelets, did not spread on perlecan and were small (**Figure 8D**), although platelets from *Mpig6b*^{-/-} mice spread to a greater extent, indicating their activation. This was not simply due to the larger size of the *Mpig6b*^{-/-} platelets, as they did not differ in size from WT platelets when spread on fibrinogen, in line with previous findings (**Mazharian et al., 2012**). Moreover, this size difference was abolished upon heparinase III treatment of perlecan, demonstrating that HS also has an activating effect on platelets, presumably through an activation receptor that is inhibited by G6b-B. Of note, platelets from *Mpig6b*^{diY/F} mice, which express physiological levels of a signaling-incompetent G6b-B, recapitulated the enhanced spreading phenotype of *Mpig6b* KO platelets (data not shown). Hence, we conclude that G6b-B signaling is required to inhibit platelet activation in the presence of HS.

We next investigated the potential effect of perlecan on MKs. Staining of WT mouse bone marrow sections revealed perlecan expression in vessel walls, which co-localized with the sinusoid marker endoglin (CD105) (**Figure 9A** and **Figure 9—figure supplement 1**). This raised the possibility that MK G6b-B is likely to come into direct contact with the HS chains of perlecan in sinusoidal vessels during MK maturation and proplatelet formation. The same observation was made in the bone marrow of G6b-B-deficient animals (**Figure 9A**). Consistent with previous findings (**Mazharian et al., 2012**), however, we observed an increased number of MKs in *Mpig6b*^{-/-} animals (**Figure 9B**), distributed throughout the bone marrow as atypical clusters (**Figure 9C** and **Figure 9—figure supplement 2**). Despite the increase in the number of MKs, *Mpig6b*^{-/-} mice showed similar frequencies of the different maturation stages of MKs, as quantified by EM (**Figure 9D,E**), arguing against an overall defect of MK maturation in *Mpig6b*^{-/-} mice.

To investigate the impact of the G6b-B interaction with HS on MKs, we analyzed the spreading and adhesion of bone marrow-derived MKs on different surfaces *in vitro* (**Figure 10**). We found that

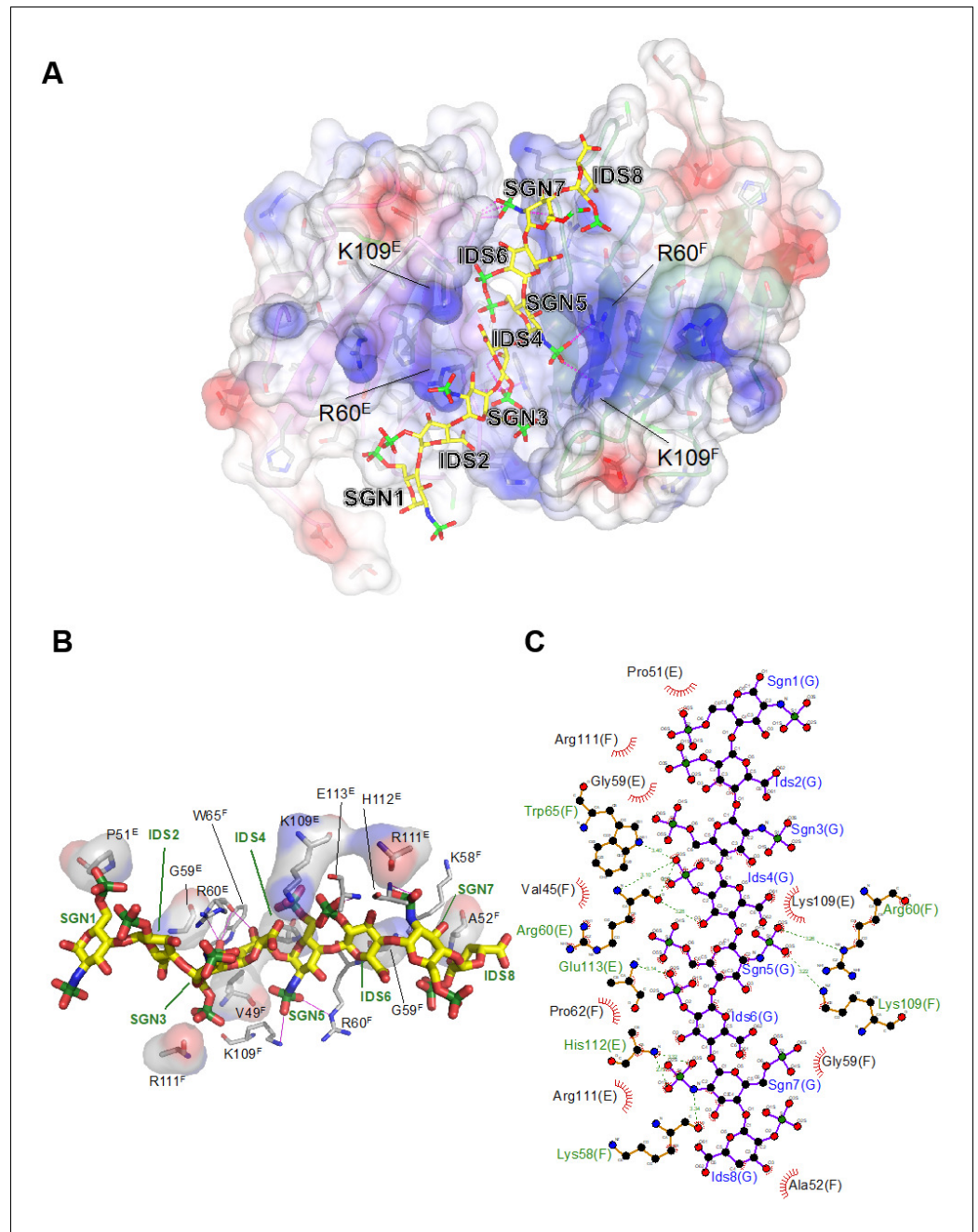


Figure 6. Electrostatic surface potential of the G6b-B ECD and representation of non-covalent contacts between heparin and G6b. **(A)** The G6b-B dimer is shown with a translucent surface colored according to electrostatic surface potential (calculated using CCP4mg). The heparin ligand is shown as a stick model and polar contacts are indicated by dashed lines in magenta. Selected residues are labeled with superscripts indicating the relevant G6b-B protein chain. **(B, C)** Representation of non-covalent contacts between heparin and the G6b dimer. **(B)** Residues of G6b-B forming non-covalent contacts with heparin. Polar contacts are indicated by dashed lines in magenta, van der Waals interactions are visualized by showing the relevant residues with their (transparent) molecular surface. Superscript capitals designate the G6b-B protein chain. **(C)** LigPlot representation of the heparin-G6b-B contacts, with van der Waals or hydrophobic interactions indicated by the bent comb symbol, and polar contacts shown as dashed lines with distance indicated in units of Å.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.024>

The following figure supplement is available for figure 6:

Figure 6 continued on next page

Figure 6 continued

Figure supplement 1. Unbiased σ_A -weighted difference density map demonstrating the presence of the heparin ligand.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.025>

only very few WT and *Mpig6b*^{-/-} MKs adhered to a perlecan-coated surface (**Figure 10**). Whilst perlecan-adherent WT MKs were small in size, *Mpig6b*^{-/-} MKs spread to a greater degree on the same substrate. The same effect was observed when perlecan was co-immobilized with fibrinogen, and heparinase III treatment abolished the difference (**Figure 10**). Hence, similar to platelets, exposure of MKs to HS resulted in increased size in the absence of G6b-B, confirming the inhibitory function of this receptor.

We next investigated the biological effects of G6b-B ligands on platelet aggregation in response to collagen, which activates platelets via the ITAM-containing receptor complex GPVI-FcR γ -chain (**Nieswandt and Watson, 2003**). Heparin and HS both enhanced platelet aggregation in response to subthreshold concentrations of collagen (**Figure 11**). This is in line with previous reports and may be explained by binding of these ligands to multiple platelet receptors (**Gao et al., 2011; Saba et al., 1984; Salzman et al., 1980**), resulting in an overall aggregation-promoting response. We did not find an effect of perlecan on collagen-mediated platelet aggregation at the concentrations tested, suggesting that perlecan must be immobilized to surface in order to provide HS chains at a sufficient density to observe the inhibitory effects observed in adhesion experiments (**Figures 8 and 9**). In addition, multiple direct and indirect effects on platelets through the perlecan protein core, as described previously (**Bix et al., 2007**), may mask an effect of the HS chains in this assay.

To overcome this limitation, we took advantage of the multivalent semisynthetic heparin proteoglycan mimetic APAC (**Lassila and Jouppila, 2014; Lassila et al., 1997**) in this assay. APAC consists of unfractionated heparin covalently coupled to a human albumin core, providing a high local density of heparin molecules. In contrast to single-chain heparin, APAC dose-dependently inhibited

Table 3. Surface plasmon resonance affinities.

Immobilized G6b-B receptor (standard configuration)

Ligand	G6b-B	K_{on}	K_{off}	K_D (M)
Heparin	Monomer	$1.12 \pm 0.39 \times 10^6$	$2.01 \pm 0.54 \times 10^{-3}$	$2.00 \pm 1.17 \times 10^{-9}$
	Dimer	$0.60 \pm 0.56 \times 10^6$	$3.16 \pm 1.17 \times 10^{-3}$	$7.76 \pm 5.30 \times 10^{-9}$
Fractionated HS	Monomer	$1.33 \pm 0.01 \times 10^5$	$9.99 \pm 0.16 \times 10^{-4}$	$7.47 \pm 0.17 \times 10^{-9}$
	Dimer	$1.20 \pm 0.08 \times 10^5$	$1.71 \pm 1.11 \times 10^{-3}$	$14.0 \pm 8.26 \times 10^{-9}$
Perlecan	Monomer	$1.94 \pm 1.72 \times 10^2$	$1.01 \pm 0.37 \times 10^{-4}$	$7.32 \pm 4.64 \times 10^{-7}$
	Dimer	$5.79 \pm 6.94 \times 10^3$	$2.28 \pm 2.51 \times 10^{-3}$	$4.74 \pm 1.34 \times 10^{-7}$
dp12	Monomer	$0.31 \pm 0.27 \times 10^6$	$2.39 \pm 1.79 \times 10^{-3}$	$8.12 \pm 1.22 \times 10^{-9}$
	Dimer	$2.50 \pm 2.72 \times 10^6$	$4.60 \pm 5.01 \times 10^{-3}$	$1.84 \pm 0.01 \times 10^{-9}$

Immobilized ligand (reversed configuration)

Ligand	G6b-B	K_{on}	K_{off}	K_D (M)
Heparin	Monomer	$1.30 \pm 0.29 \times 10^5$	$8.85 \pm 0.40 \times 10^{-2}$	$6.99 \pm 1.25 \times 10^{-7}$
	Dimer	$3.28 \pm 0.53 \times 10^5$	$1.73 \pm 0.04 \times 10^{-3}$	$5.33 \pm 0.75 \times 10^{-9}$
Fractionated HS	Monomer	$9.22 \pm 2.67 \times 10^3$	$6.40 \pm 0.33 \times 10^{-3}$	$7.31 \pm 2.47 \times 10^{-7}$
	Dimer	$3.76 \pm 4.69 \times 10^4$	$4.58 \pm 6.32 \times 10^{-4}$	$7.70 \pm 7.21 \times 10^{-9}$
Perlecan	Monomer	$6.73 \pm 3.38 \times 10^3$	$1.28 \pm 0.24 \times 10^{-3}$	$2.28 \pm 1.51 \times 10^{-7}$
	Dimer	$4.90 \pm 2.16 \times 10^4$	$6.78 \pm 2.57 \times 10^{-4}$	$1.41 \pm 0.09 \times 10^{-8}$

Values are means \pm SD from two independent experiments.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.027>

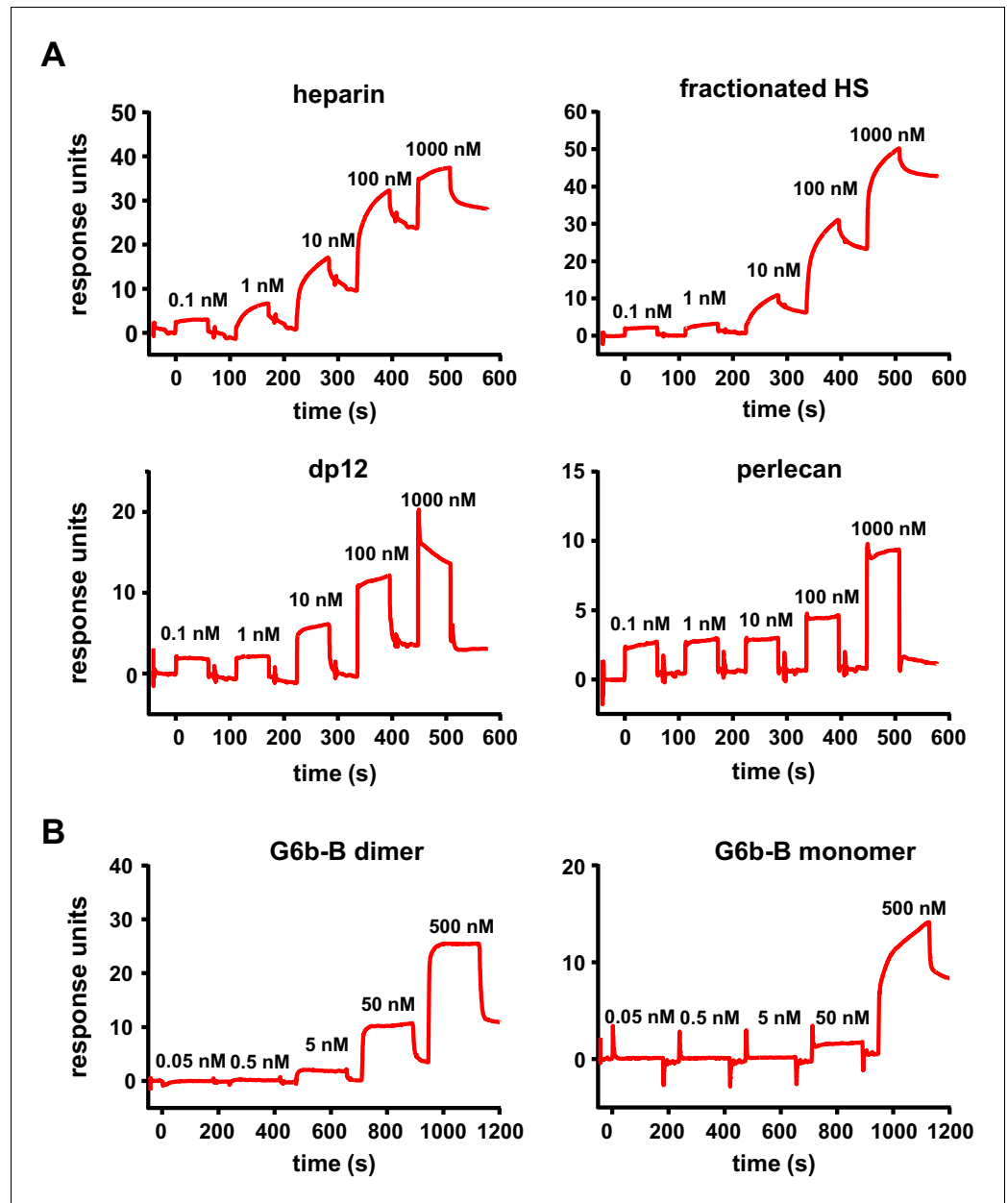


Figure 7. High-affinity interaction between G6b-B and its ligands. Representative traces of the surface plasmon resonance experiments, results of which are presented in [Table 3](#). (A) Binding of the indicated compound to immobilized dimeric G6b-B in the standard configuration. (B) Results from the reversed configuration, depicting traces of dimeric and monomeric G6b-B binding to immobilized heparin.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.026>

collagen-induced platelet aggregation ([Figure 11](#)), with an almost complete block observed at 0.5 μ M, as previously described ([Lassila and Jouppila, 2014](#)).

We next examined the effect of heparin and APAC on WT and G6b-B deficient platelets using a flow-cytometric approach, sufficing much smaller sample volumes than aggregation assays, using integrin α IIb β 3 activation (fibrinogen-A488 binding) and degranulation-dependent TLT-1 surface exposure ([Smith et al., 2018](#)) as markers for platelet activation. APAC and heparin had no detectable effect on WT platelets, but APAC induced robust integrin activation and platelet secretion in G6b-B deficient platelets, demonstrating a platelet-activating effect of this compound in the

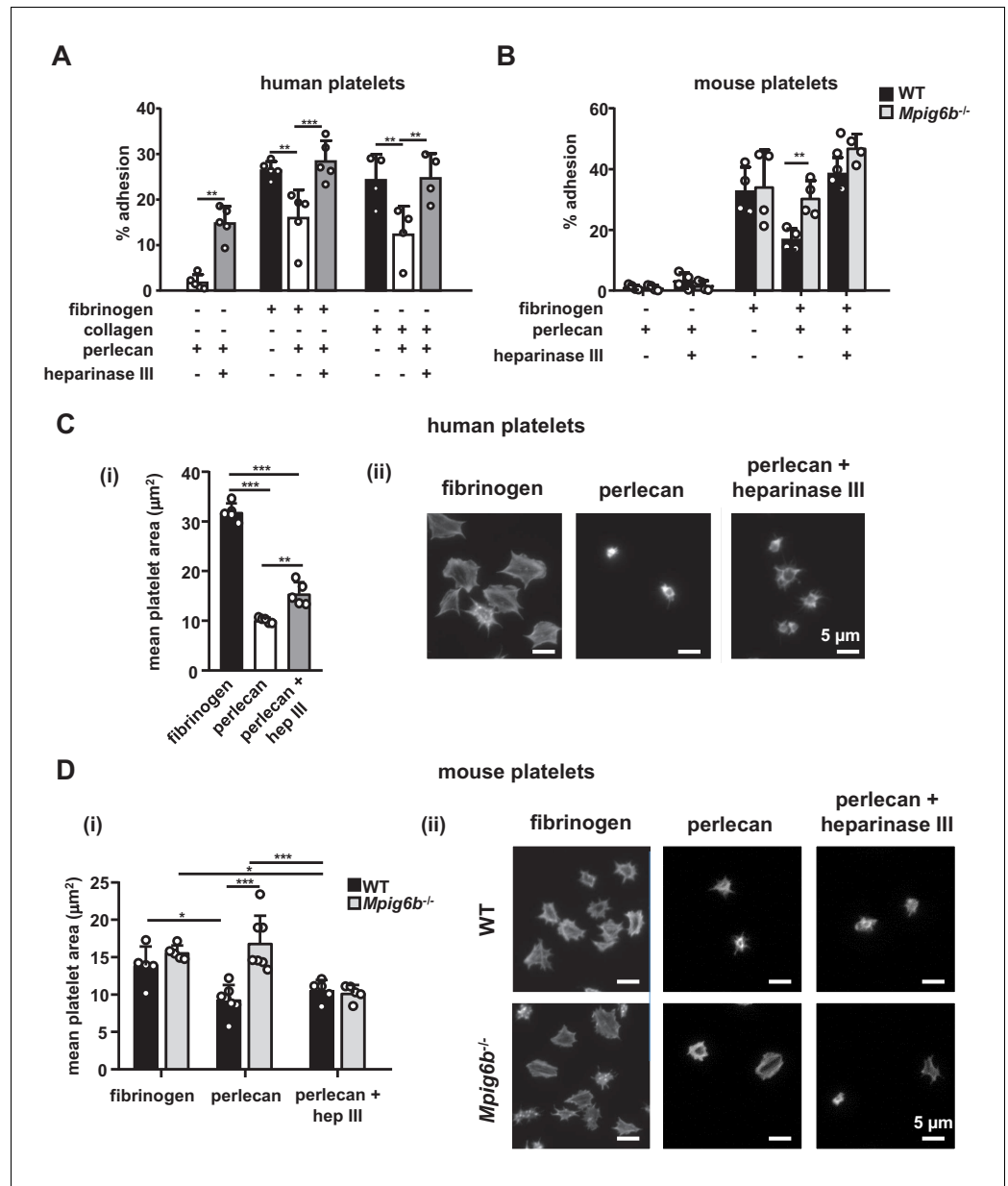


Figure 8. Heparan sulfate removal of perlecan facilitates platelet adhesion. The indicated substrates were coated alone or in combination onto wells in 96-well plates (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ collagen and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for all other substrates) overnight. Where indicated, wells were treated with 5 mU/ml heparinase III. Platelets from (A) humans or (B) mice were allowed to adhere for 1 hr and adhesion was quantified colorimetrically with 4-nitrophenyl phosphate (pNPP). (A) Human, platelets; $n = 4\text{--}5$ individual donors from 3 to 4 independent experiments; P-values were calculated using one-way ANOVA with Sidak's post-hoc test. (B) Mouse platelets; $n = 4$ samples/condition/genotype from two independent experiments. Owing to severe thrombocytopenia, platelets from up to five mice were pooled for one KO sample. P-values for differences between WT and *Mpig6b*^{-/-} mice were calculated using two-way ANOVA with Sidak's post-hoc test. (C, D) Adhesion of (C) human or (D) WT and *G6b*^{-/-} platelets on fibrinogen and perlecan. (i) Mean surface area of individual platelets quantified by KNIME software analysis. In panel (C) (i) $n = 5$ donors from two independent experiments. P-values were calculated using one-way ANOVA with Sidak's post-hoc test. Total number of cells analyzed: fibrinogen, 1957; perlecan, 239; perlecan + heparinase III, 686. In panel (D) (i) $n = 5\text{--}7$ mice/condition/genotype from 2 to 3 independent experiments. P-values were calculated using two-way ANOVA with Sidak's post-hoc test. Total number of cells analyzed: 134–176 for perlecan conditions, and 913–1277 for fibrinogen conditions. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; and ***, $p < 0.001$. (ii) Representative images of platelets stained for actin with phalloidin-Alexa-488; scale bar: 5 μm ; hep III, heparinase III.

Figure 8 continued on next page

Figure 8 continued

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.028>

The following figure supplement is available for figure 8:

Figure supplement 1. Mean surface area of individual adherent platelets.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.029>

absence of G6b-B (**Figure 12A**). Next, we aimed to investigate the impact of G6b-B ligands on ITAM-mediated platelet activation in WT and *Mpig6b* KO mice. Owing to severe reduction of GPVI receptor levels in G6b-B deficient animals, we stimulated platelets with an antibody directed against the hemi-ITAM receptor CLEC-2, expression of which is not affected by G6b-B deficiency (**Mazharian et al., 2012**). APAC, but not heparin, significantly inhibited platelet degranulation and fibrinogen binding in response to CLEC-2 stimulation in WT platelets. Importantly, this inhibitory effect of APAC on degranulation was not observed in platelets from G6b-B-deficient animals (**Figure 12B**). Fibrinogen binding was also significantly reduced by APAC in G6b-B-deficient mice, but to a lesser extent than in WT platelets (**Figure 12B**). The inhibitory effect of APAC was also absent in the platelets from *Mpig6b*^{diY/F} mice, which express a signaling-incompetent form of G6b-B (**Figure 12C**). Hence, we conclude that APAC suppresses CLEC-2-mediated platelet activation via G6b-B by recruiting the downstream phosphates Shp1 and Shp2. Overall, these findings demonstrate that multivalent G6b-B ligands inhibit platelet activation via (hemi)ITAM receptors, whereas soluble single-chain molecules do not.

Conjugated heparin induces the phosphorylation of G6b-B and downstream signaling

We performed signaling studies to gain mechanistic insights into the opposing effects of soluble heparin vs. conjugated heparin. Washed human platelets were incubated with heparin or APAC, and their lysates were immunoblotted with an anti-phospho-tyrosine antibody (p-Tyr). Both heparin or APAC induced moderate changes in whole-cell tyrosine phosphorylation as compared to collagen, with APAC having a stronger effect (**Figure 13A**). The most pronounced change observed in response to G6b-B ligation was an increase in the signal intensity of a 150 kDa protein, as well as of a doublet in the heparin- and APAC-treated sample migrating at 27 and 32 kDa, which correlated with glycosylated and non-glycosylated human G6b-B. Hence, we assessed the phosphorylation status of G6b-B using custom phospho-tyrosine-specific G6b-B antibodies directed against phosphorylated ITIM and ITSM of G6b-B (**Figure 13A**), and by immunoprecipitating the receptor and blotting with the p-Tyr antibody (**Figure 13—figure supplement 1A**). Heparin, and to a greater extent APAC, enhanced the basal phosphorylation of G6b-B, which was accompanied by an increase in Shp1 and Shp2 association (**Figure 13A** and **Figure 13—figure supplement 1**). Similar results were obtained with HS, but to a lesser extent than with either heparin or APAC (**Figure 13—figure supplement 1B**). Perlecan did not induce the phosphorylation of G6b-B, in line with our observation in the aggregation assay, suggesting perlecan must be surface-immobilized to have an effect on platelets (**Figure 13—figure supplement 1A**).

Using a quantitative capillary-based gel electrophoresis platform (ProteinSimple Wes), we investigated the effects of heparin and APAC on the phosphorylation status of the tyrosine phosphatases Shp1 (pTyr562) and Shp2 (p-Tyr580 and p-Tyr542), which are essential effectors of G6b-B signaling (**Geer et al., 2018**). Strikingly, APAC induced prominent phosphorylation of Shp1 and Shp2, whereas heparin only induced modest changes in Shp2 phosphorylation (**Figure 13B**). We also observed a marginal increase in SFK phosphorylation (p-Tyr418) in platelets treated with heparin and APAC, correlating with increased phosphorylation of G6b-B under these conditions (**Figure 13B**).

Subsequently, we compared the effects of heparin and APAC on GPVI signaling in response to an intermediate concentration of collagen (3 μ g/ml). Although both compounds further enhancing collagen-induced phosphorylation of G6b-B, and although APAC also enhances the phosphorylation of Shp phosphatases (**Figure 13B**), whole-cell phosphorylation remained largely unaltered (**Figure 13A**). Similarly, we also found no inhibitory effect of heparin or APAC on Src (p-Tyr418) and Syk (p-Tyr525/6) phosphorylation, both critical kinases for initiating and propagating GPVI signaling (**Senis et al., 2014**) (**Figure 13B**).

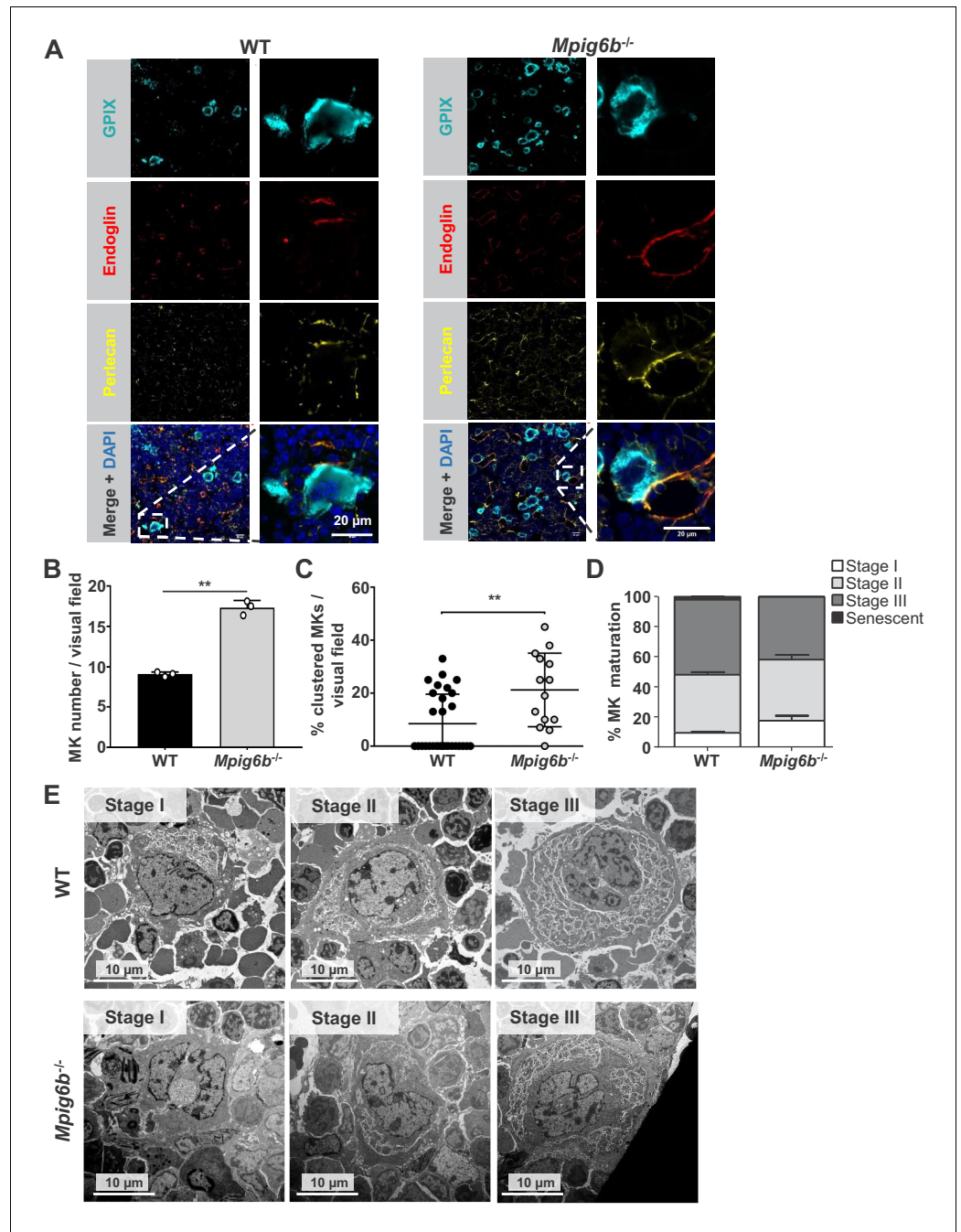


Figure 9. Megakaryocytes come into contact with perlecan in the bone marrow. (A) Analysis of immunofluorescent images of murine femur sections from WT and *Mpig6b*^{-/-} mice. Sinusoids were marked using anti-endoglin (CD105) and MKs by anti-GPIX antibodies. Perlecan is abundantly expressed within the bone marrow cavity, present in intersinusoidal spaces and part of basement membranes in sinusoids and arterioles. MKs come into contact with perlecan. Scale bar: 20 μm. (B) Quantification of MKs in the bone marrow of WT and *Mpig6b*^{-/-} mice; three animals of each genotype with five images per animal were analyzed. (C) Analysis of MK clustering, with % of clustered MKs per visual field with a total number of three mice per genotype analyzed; P values were calculated with Mann-Whitney U-test **, p<0.01. (D) Classification of the MK according to their maturation stage: stage I (absence of granules), stage II (granules and developing demarcation membrane system (DMS) not yet organized), stage III (DMS organized in cytoplasmic territories). Data are reported as the percentage of the total number of MK. Bars represent the mean ± SEM in three bone marrow samples (total number of MK

Figure 9 continued on next page

Figure 9 continued

counted 395–469). (E) Representative transmission electron microscopy (TEM) images of bone marrow from WT and *Mpig6b*^{-/-} mice. Bars: 10 μm.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.030>

The following figure supplements are available for figure 9:

Figure supplement 1. Overview sections of the bone marrow from WT and *Mpig6b*^{-/-} mice.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.031>

Figure supplement 2. *Mpig6b*^{-/-} megakaryocytes form clusters.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.032>

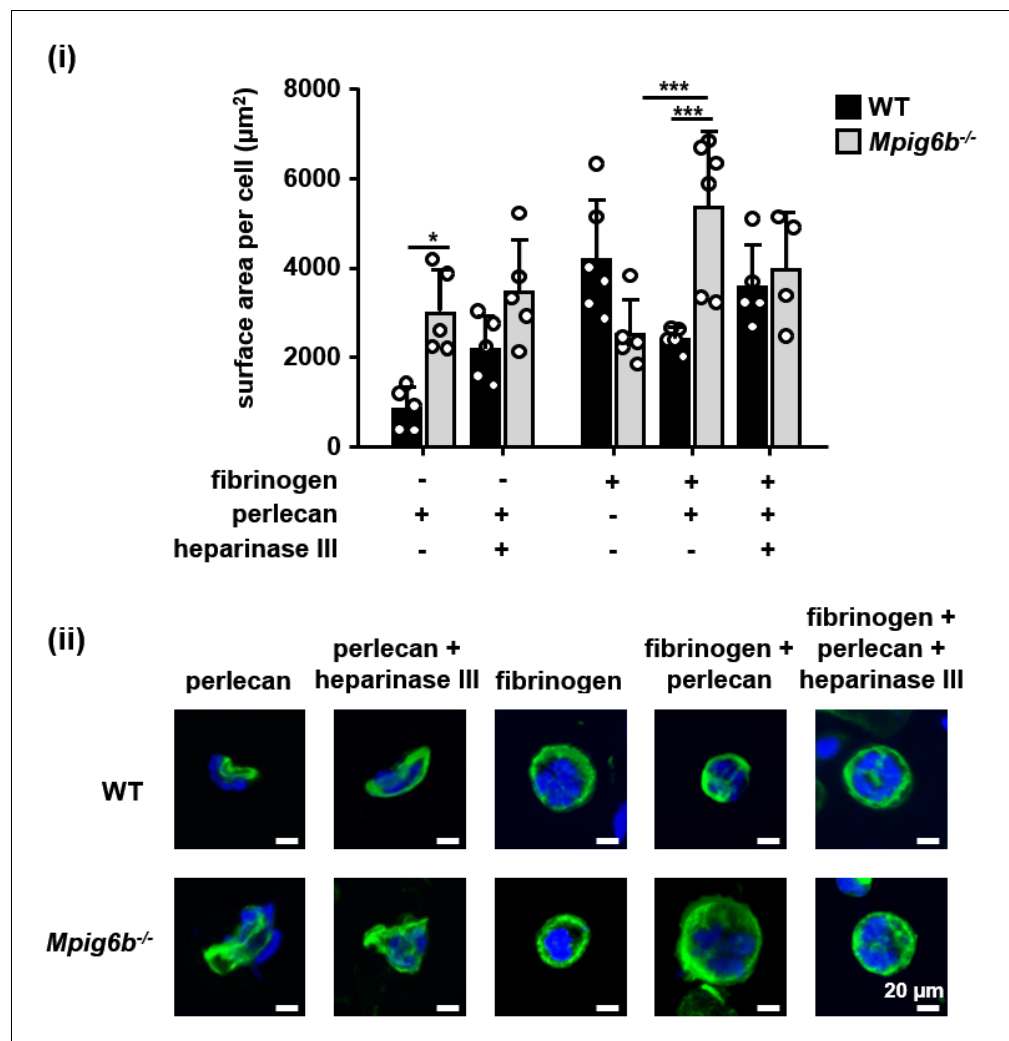


Figure 10. *G6b* knockout megakaryocytes show enhanced spreading on perlecan. Adhesion of WT and *Mpig6b*^{-/-} MKs on perlecan. (i) Mean surface area of MKs was quantified with ImageJ. n = 4–6 mice/condition/genotype from three independent experiments; total cell numbers analyzed per condition/genotype were 77–188 for conditions with perlecan only and 1671–2866 for conditions with fibrinogen. P values were calculated using two-way ANOVA with Sidak’s post-hoc test, ***, p<0.001; *, p<0.05. (ii) Representative images of platelets stained for tubulin (green) and DAPI (blue); scale bar: 20 μm.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.033>

To corroborate that the APAC-induced increase in Shp1 and Shp2 phosphorylation are mediated by G6b-B, we conducted signaling experiments in platelets from WT and *Mpig6b*^{-/-} mice. APAC treatment of WT platelets recapitulated the effects observed in human platelets, showing only a modest change in overall phosphorylation pattern, and an increase in Shp1 and Shp2 phosphorylation (Figure 13C,D). By contrast, APAC-induced robust tyrosine phosphorylation in G6b-B-deficient platelets (Figure 13C), indicative of reduced inhibitory signaling and platelet hyperreactivity the absence of G6b-B. Strikingly, this was accompanied by reduced tyrosine phosphorylation of Shp1 and Shp2 in these platelets compared with WT platelets (Figure 13D). Collectively, these findings demonstrate that heparin and APAC have a direct effect on G6b-B phosphorylation, however, only the high-density ligand APAC is able to induce robust downstream inhibitory signaling via G6b-B, culminating in Shp1 and Shp2 binding and tyrosine phosphorylation.

Discussion

In this study, we present evidence that establishes G6b-B as a functional receptor of HS and heparin. Little was known about the effects of GAGs on platelet and megakaryocyte function and the underlying molecular mechanisms, thus these findings represent a major advance in our understanding of the interaction, and of the biological and biochemical effects, of GAGs on these cells. Using a mass-spectrometry-based approach and subsequent *in vitro* binding assays, we identified the HS chains of perlecan as a physiological binding partner of G6b-B. The binding of G6b-B to HS was corroborated by a cell-based CRISPR KO screening, which identified molecules involved in the HS synthesis pathway as a prerequisite of G6b-B binding. There are two possible explanations as to why this assay did not identify perlecan, nor any other individual HSPGs as binding partners of G6b-B: first, the CRISPR screening approach will not identify genes that are essential for cell viability; and second, it will not identify proteins that have redundant functions. Given that perlecan is secreted from endothelial and smooth muscle cells, it is possible that there could be HSPGs other than perlecan (syndecans/glypicans) on the cell surface that carry the GAG chains in HEK cells. As the molecules in the HS synthesis pathway are essential for their respective synthesis, they can be identified in this approach more easily. This potential redundancy of HSPGs may also exist *in vivo*, and we cannot exclude the possibility that G6b-B may interact with other HSPGs in the cardiovascular system.

As with many other HS-binding molecules, G6b-B also binds structurally related heparin (Xu and Esko, 2014). Indeed, the interaction between heparin and G6b-B had been described previously, but the molecular details of the interaction and their functional significance had not been determined (de Vet et al., 2005). HS chains are not homogeneously sulfated; instead, highly sulfated residues are clustered in domains along the polymer (called N-sulfated (NS) or sulfated (S) domains), which are interspersed by stretches of N-acetylated disaccharides (NA domains) that are largely devoid of sulfate groups (Murphy et al., 2004; Xu and Esko, 2014). Heparin, a degradation product derived from HS isolated from porcine intestine, shows larger NS domains and a greater degree of sulfation than HS. Hence, it is often used as an analogue for the NS domains of HS, despite the limitation that it may lack the protein binding properties of less sulfated HS. Our structural analysis of the G6b-B ligand complex shows that G6b-B interacts with multiple sulfates in the heparin oligosaccharide. Hence several observations, including the higher potency of heparin in inducing G6b-B phosphorylation as compared to HS, and the shift in dose-response curve in aggregometry, may be due to the larger NS domains in the heparin molecule. In addition, synthesis of HS is not template-driven, therefore, the length and distribution of such domains is regulated in a tissue- or cell-specific manner, adding additional complexity to the regulatory role of HS.

Our size-exclusion chromatography data demonstrate that the dimerization of G6b-B is induced by the heparin ligand. The crystal structure of heparin-bound G6b-B reveals the mode of ligand binding and how the binding of this ligand induces ectodomain dimerization. The contact surfaces between the G6b-B dimer and the Fab fragments are spatially separated from the heparin-binding site, suggesting that the presence of the Fab fragments does not interfere with heparin binding. Heparin-dependent, non-constitutive dimerization of G6b-B is consistent with the small interface between the G6b-B subunits and the absence of main chain-main chain hydrogen bonds across the β -sheet of the binding surface. Among 34 entries currently in the PDB of structures containing heparin as a ligand, dimeric assemblies (or multimeric assemblies with a two-fold rotation axis) are common (Figure 14—figure supplement 1), but the anti-parallel alignment of two Ig-like domains in the

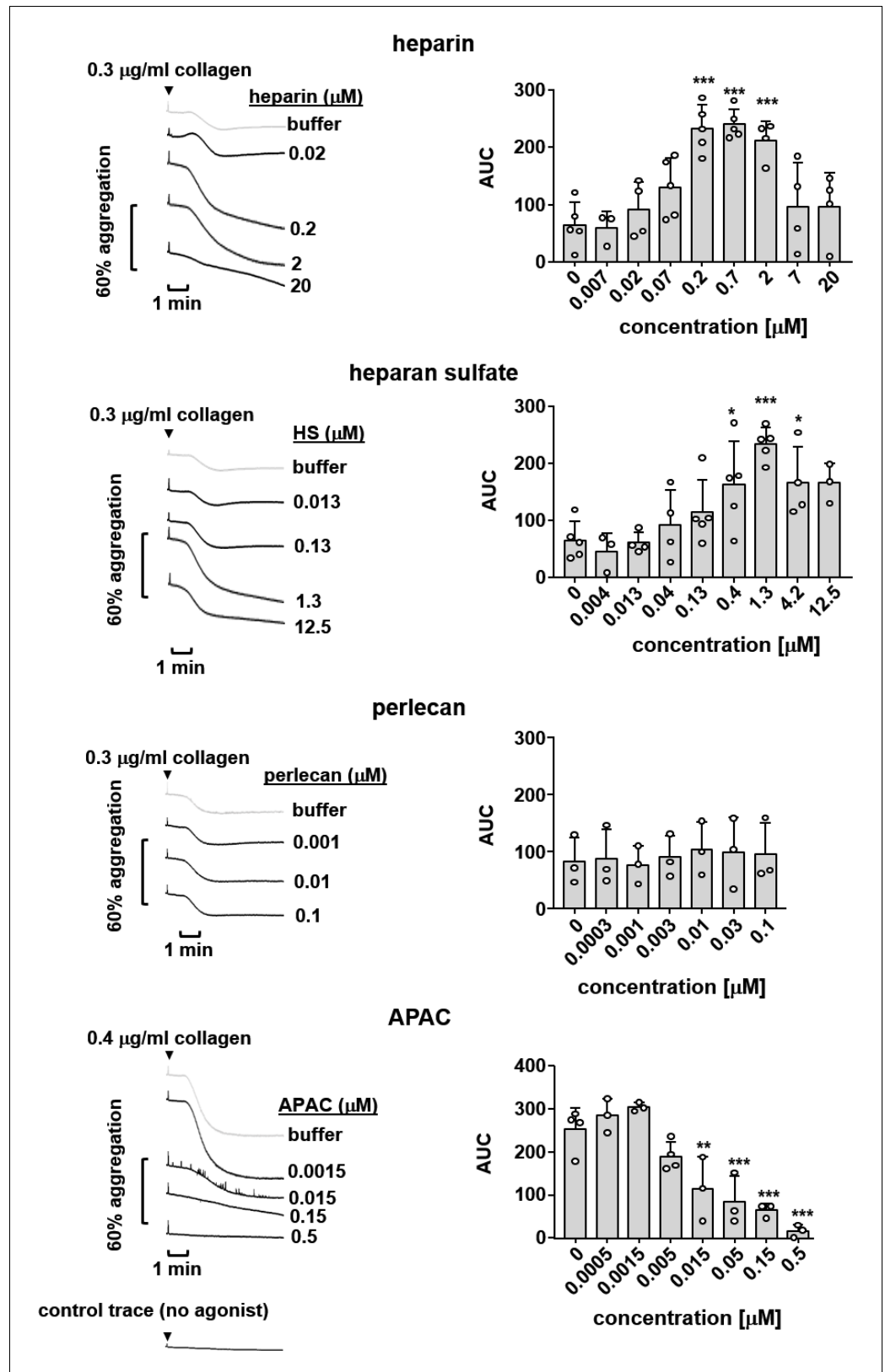


Figure 11. Effects of G6b-B ligands on platelet aggregation. Human platelet rich plasma (PRP) was incubated with the indicated compound for 90 s prior to agonist addition. Aggregation traces were recorded on a Chronolog four
 Figure 11 continued on next page

Figure 11 continued

channel aggregometer. Averaged aggregation traces (left) and area under the curve (AUC) quantification (right) of platelet aggregation (n = 3–5 per condition). P-values were calculated using one-way ANOVA with Dunnett's post-hoc test and refer to the untreated control. ***, p<0.001; **, p<0.01; and *, p<0.05.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.034>

heparin-bound structure of G6b-B appears to be unique (Cai et al., 2015; Dahms et al., 2015; Fukuhara et al., 2008; Pellegrini et al., 2000; Schlessinger et al., 2000). The involvement of the β -sheet surface in heparin binding is somewhat reminiscent of how carbohydrate-binding modules (CBM) bind saccharide ligands (Abbott and van Bueren, 2014). CBMs are non-enzymatic domains often associated with carbohydrate-active enzymes, which contribute to carbohydrate binding and discrimination (Boraston et al., 2004).

The crystal structure of G6b-B shows a prominent positively charged electrostatic surface area, but this positive surface patch runs perpendicular to the central cleft of the G6b-B dimer. Indeed, the heparin oligosaccharide lines up with the cleft, rather than extending along the positive surface patch. Comparison with other heparin-bound structures (Figure 14—figure supplement 1) suggests that charge complementation is not the sole determinant of the mode of heparin binding, and that the depth and shape of the docking site are likely to be important as well. Nevertheless, charge complementing ionic interactions lock the ligand in to register at the center of the G6b-B binding cleft, where the sparsity of sulfate-Arg or sulfate-Lys interactions is surprising. The crystal structure rationalizes the diminished binding of G6b-B transfected HEK293 cells to biotinylated heparin when the four basic residues Lys54, Lys58, Arg60 and Arg61 are simultaneously mutated. Among these four side-chains, the key interaction appears to be with Arg60, as Arg61 is shielded through G6b-B dimerization from the ligand, Lys54 is well separated from the binding cleft and Lys58 is situated within a 4 Å-radius of heparin, but makes no polar interactions. The heparin ligand does not exhaust the possibilities for specificity-determining interactions with G6b-B in the ligand-binding cleft. For instance, Arg60^F and Lys109^F, but not their counterparts in chain E on the opposite side of the cleft, are involved in ionic interactions with the same sulfate group. It is conceivable that the physiological HS ligand of G6b-B may have a different pattern of sulfate groups that engage both Arg60 and Lys109, perhaps in addition to Lys58.

Since G6b-B shows a considerable degree of glycosylation, the question arises as to whether this might modulate the ligand interaction. Through the course of our structural analysis of G6b-B, we identified multiple glycosylation sites (N32, S67, S68, S69, T71, T73) in the G6b-B ectodomain. Although most of these sites can be mutated to increase protein homogeneity for crystallization studies, the final structure of the G6b-B–heparin complex revealed that all of these glycosylation sites are spatially separated from the ligand-binding surface, and are not likely to impede ligand binding sterically. All of the recombinant G6b-B molecules used in this study were produced in mammalian cell lines and are therefore glycosylated. We previously showed that MK and platelet G6b-B migrate at the same molecular weight by Western blotting (Mazharian et al., 2012), suggesting that G6b-B is not differentially glycosylated in MKs and platelets. We currently have no evidence that the glycosylation of G6b-B alters ligand binding.

Investigating the functional consequences of this interaction revealed that heparin and HS have complex effects on platelet function and that G6b-B is a key regulator in this process. Our data demonstrates that, to induce robust inhibitory biological or signaling effects, G6b-B ligands need to be either immobilized to a surface, as in the case of perlecan-coated plates, or multivalent, as in the case of APAC. By contrast, single-chain heparin and HS enhanced rather than inhibited platelet aggregation. These findings are in line with numerous previous reports, showing enhancing effects of heparin on platelet aggregation in platelet-rich plasma (Gao et al., 2011; Saba et al., 1984; Salzman et al., 1980). This most likely also contributes to a mild drop in platelet counts in patients receiving heparin, referred to as non-immune heparin-induced thrombocytopenia (Cooney, 2006). On the basis of our signaling data and size-exclusion chromatography data, we assume that heparin, despite being able to dimerize the receptor, fails to cluster G6b-B sufficiently into higher-order oligomers to induce robust downstream signaling (Figure 14A,B). It remains to be determined whether the enhancing effects of heparin and HS on platelet aggregation is mediated by

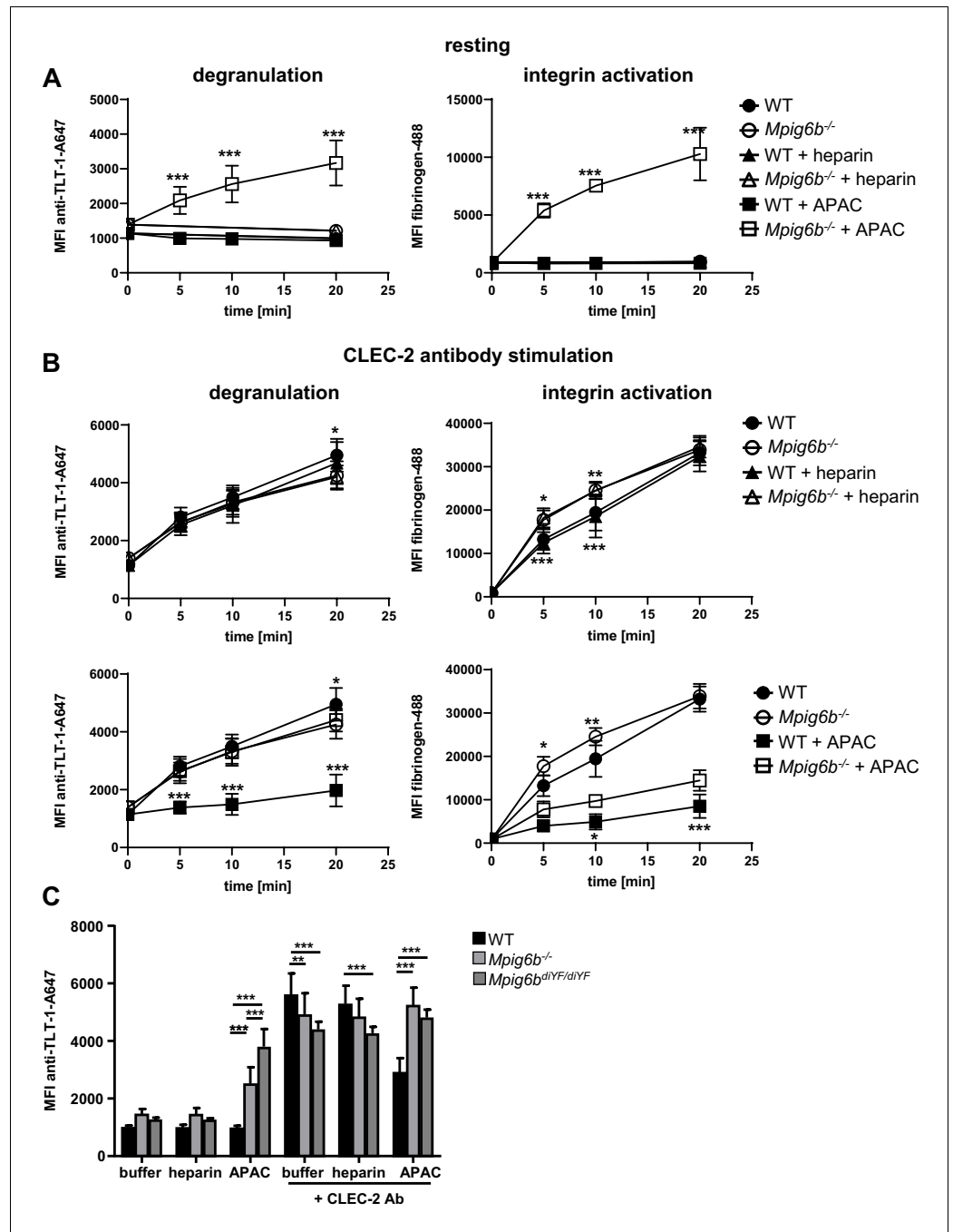


Figure 12. APAC inhibits CLEC-2-mediated degranulation in WT but not *Mpi6b* KO platelets. Mouse blood, diluted 1:10 in Tyrode's buffer was incubated with the indicated compounds (0.05 μ M) in the (A) absence or (B) presence of a stimulating CLEC-2 (3 μ g/ml) for the indicated time. Samples were fixed and TLT-1 surface levels, a marker for platelet degranulation or fibrinogen-Alexa488 binding (a measure of integrin activation), were determined by flow cytometry. $n = 5-6$ mice/condition/genotype from two independent experiments. P-values were calculated using (A) two-way ANOVA with Sidak's post-hoc test (comparison of WT APAC vs *Mpi6b*^{-/-} APAC) or (B) two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test, and refer to the difference between WT and *Mpi6b*^{-/-}. ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; and *, $p < 0.05$. (C) Mouse blood was incubated with the indicated compounds for 20 min. Samples were fixed and TLT-1 surface levels were determined by flow cytometry. $n = 6-8$ mice/condition/genotype from three independent experiments. P-values were calculated using two-way ANOVA with Tukey's post-hoc test. ***, $p < 0.001$; and ** $p < 0.01$. Source data are available in [Figure 12—source data 1](#).

Figure 12 continued on next page

Figure 12 continued

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.035>

The following source data is available for figure 12:

Source data 1. Source data for graphs shown in **Figure 12A–C**.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.036>

reducing the inhibitory effects of G6b-B alone or by additional effects on other platelet receptors, which promote platelet activation, such as the integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, previously shown to bind heparin (Fitzgerald et al., 1985; Gao et al., 2011; Sobel et al., 2001).

In contrast to these soluble, monovalent ligands, the HS side-chains of immobilized perlecan exerted an inhibitory effect on platelets, as evidenced by the impaired adhesion of platelets to collagen and fibrinogen. This extends observations from previous reports describing the anti-adhesive properties of the HS chains of perlecan, although the underlying mechanism was not known (Klein et al., 1995; Lord et al., 2009). Moreover, heparinized polymers showed less platelet adhesion than their non-heparinized counterparts (Han et al., 1989; Lindhout et al., 1995; Olsson et al., 1977). Our results with platelets from G6b-B-deficient mice demonstrate that heparin or HS engagement by G6b-B on these surfaces induces an inhibitory signal, blocking platelet activation and adhesion.

The failure of perlecan to have an effect on collagen-mediated platelet aggregation and platelet signaling in solution might simply be a consequence of the test conditions and suggests that it must be immobilized to a surface in order to present HS chains at a density sufficient to induce the inhibitory effects observed. Hence, to determine the effect of G6b-B clustering in solution, we took advantage of APAC, which mimics naturally occurring macromolecular heparin proteoglycans and harbors a higher GAG density than perlecan. On the basis of our findings, and given the dependence of G6b-B binding to sulfate groups and the common use of heparin as an analog for the NS domains of HS (Xu and Esko, 2014), we concluded that the inhibitory effect of both APAC and the HS chains of perlecan is mediated by clustering G6b-B. We compared the effect of APAC to that of single-chain heparin, which differ only by the clustering of the chains, but not the structure or composition of the polysaccharide chains. Similar to previous reports (Kauhanen et al., 2000; Lassila and Jouppila, 2014; Lassila et al., 1997), we found that APAC inhibited platelet activation via the ITAM-containing GPVI-FcR γ -chain receptor complex, and also via the hemi-ITAM-containing receptor CLEC-2. Thus, by increasing the clustering capacity of heparin to a multivalent form, an inhibitory effect on platelet function was achieved in solution. In line with this observation, we found that APAC induced stronger phosphorylation of G6b-B, which was accompanied by the association and phosphorylation of the tyrosine phosphatases Shp1 and Shp2, which is not observed in G6b-B-deficient platelets. We therefore conclude that clustering of G6b-B receptor dimers into higher-order oligomers by an immobilized or multivalent ligand is required for the inhibitory effect on platelet function (Figure 14C).

Perlecan is secreted by endothelial and smooth muscle cells into the extracellular space of the vessel wall and hence is inaccessible by platelet G6b-B in an intact blood vessel (Murdoch et al., 1994; Saku and Furthmayr, 1989; Segev et al., 2004). Only upon vascular injury will the interaction between platelet G6b-B and perlecan occur, resembling the interaction of other platelet receptors with ligands that are expressed in the vessel wall, including collagen, laminin and fibronectin (Bergmeier and Hynes, 2012). Given the results of our adhesion assay, we speculate that the interaction of platelet G6b-B with perlecan negatively regulates the initial steps of thrombus formation, preventing thrombi from forming unnecessarily.

The G6b-B-HS interaction may also be relevant for triggering the directional formation of proplatelets by MKs towards sinusoidal blood vessels at sites of platelet production. A key, yet unresolved, question is how MKs remain relatively refractory and do not release platelets into the ECM-rich environment of the bone marrow despite expressing the same repertoire of cell-surface receptors as platelets. G6b-B is highly expressed in mature MKs and G6b-B KO and loss-of-function mice show a severe macrothrombocytopenia resulting from impaired proplatelet formation and platelet production, which is accompanied by an increase in MK numbers in the bone marrow (Geer et al., 2018; Mazharian et al., 2012). Here, we provide first evidence for a potential role of perlecan in regulating

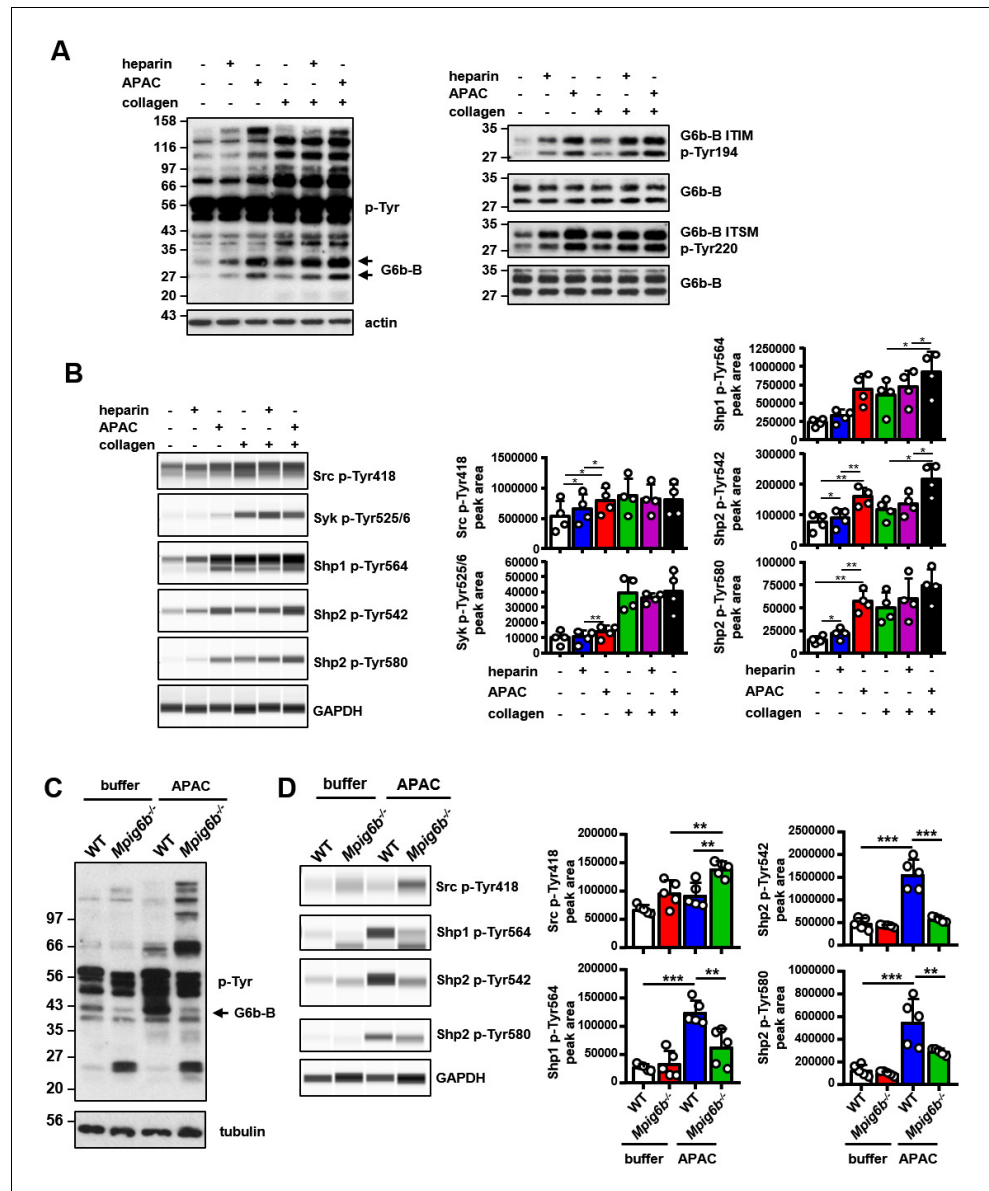


Figure 13. APAC induces G6b-B phosphorylation and downstream signaling. (A) Washed human platelets (5×10^8 /ml) were incubated for 90 s with $0.05 \mu\text{M}$ APAC, $0.7 \mu\text{M}$ heparin or buffer in the presence of $10 \mu\text{M}$ integrilin. Where indicated, platelets were additionally stimulated with $3 \mu\text{g/ml}$ collagen for 90 s following compound treatment. Samples were lysed and whole cell lysates (WCL) were analyzed by western blotting. Representative western blots are from $n = 3\text{--}5$ independent experiments. (B) Lysates were also analyzed by quantitative capillary-based gel electrophoresis with the indicated antibodies. Representative data are displayed as blots on the left and as quantified peak areas on the right. (C, D) Washed mouse platelets (5×10^8 /ml) were incubated for 90 s with $0.05 \mu\text{M}$ APAC or buffer in the presence of $10 \mu\text{M}$ lotrafiban. Samples were analyzed as described above. The *Mpig6b*^{-/-} samples show IgG light chain fragments, which result from IgG binding to the platelet surface. P-values were calculated using one-way ANOVA with Sidak's post-hoc test. ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; and *, $p < 0.05$. p-Tyr, anti-phosphotyrosine (4G10).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.037>

The following figure supplement is available for figure 13:

Figure supplement 1. Effects of G6b-B ligands on G6b-B phosphorylation.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.038>

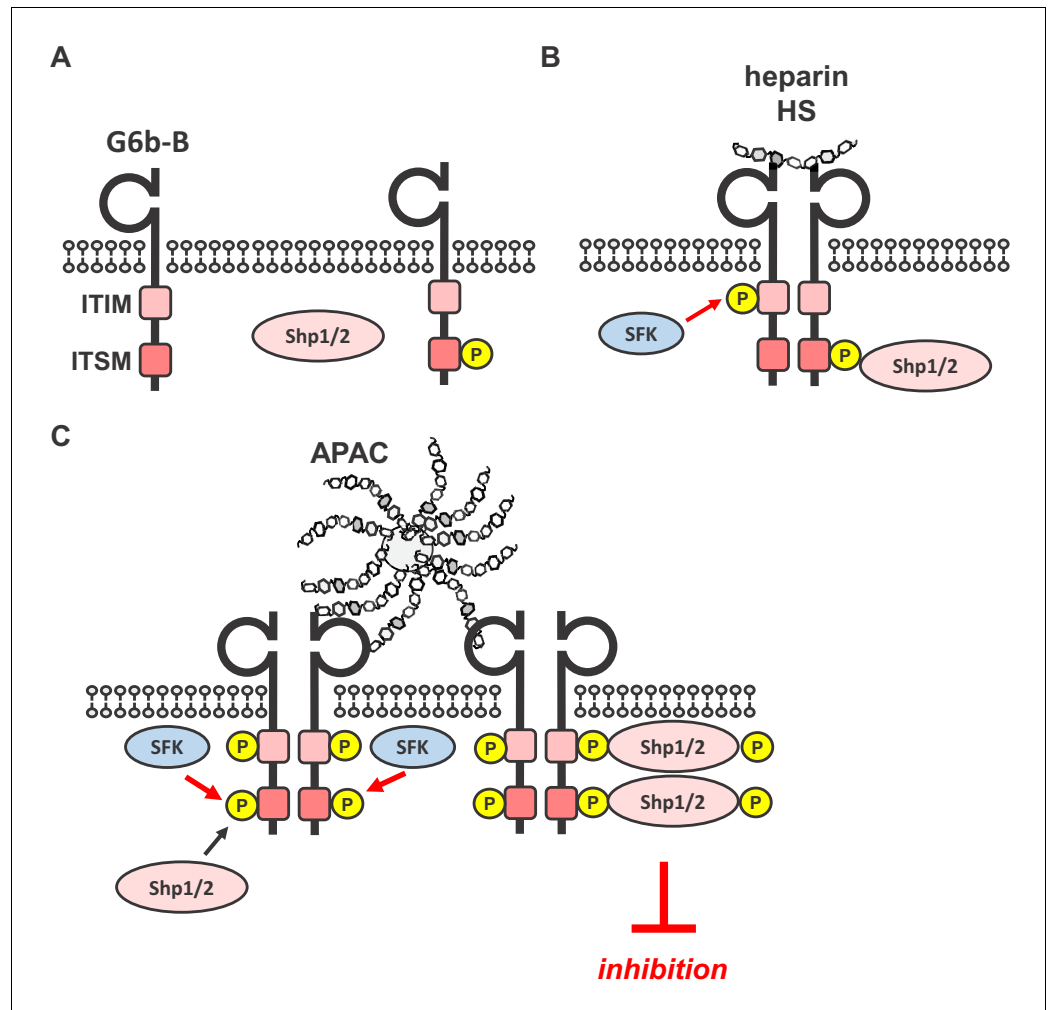


Figure 14. Simplified model of glycan-mediated regulation of G6b-B function. (A) In the absence of any ligand, G6b-B is mainly present in a monomeric state and phosphorylated to a low degree. (B) Small soluble ligands, for example heparin, induce the dimerization of the receptor, but induce only mild G6b-B phosphorylation and downstream signaling. (C) Multivalent ligands, for example the HS chains of vessel-wall perlecan (not shown) or the heparin molecules in APAC, cluster G6b-B dimers into higher-order oligomers. Hence, they facilitate downstream signaling of G6b-B, including robust phosphorylation of G6b-B and downstream Shp1 and Shp2 phosphatases, resulting in the inhibition of platelet activation. SFK, src family kinase.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.039>

The following figure supplement is available for figure 14:

Figure supplement 1. Selected structures of proteins with a heparin ligand.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.040>

MK function by demonstrating that G6b-B-deficient, but not WT, MKs increase their size in the presence of the HS side-chains of perlecan, indicating cellular activation. Because it has been shown in vitro (Mazharian et al., 2012) and ex vivo (this publication) that G6b-B-deficient MKs have no overt maturation defect and as an increase in size was only observed in the presence of the HS chains of perlecan, it seems unlikely that the increase in size results from an overall maturation defect of the MKs. In addition, findings from our study and others demonstrate that perlecan is abundantly expressed in the bone marrow ECM and comes into contact with mature MKs (Farach-Carson et al., 2014). We hypothesize that the MK G6b-B-HS interaction might play a role in regulating polarized proplatelet formation in the sinusoidal blood vessel lumen.

Despite sharing a common structure, the biophysical details of HS are tissue- or cell-specific, including variability of sulfation patterns, suggesting that the regulatory role of HS occurs in a spatio-temporal manner in different tissues and at different developmental and pathological stages. Hence, future research is needed to investigate whether and to what extent G6b-B interacts with other HS proteoglycans and to determine the physiological relevance of these interactions under normal and pathological conditions, such as cardiovascular disease in which the composition of the vascular glycocalyx is altered (Kim *et al.*, 2017). Moreover, our results also demonstrate that platelets and MKs from G6b-B-deficient mice showed an activation response towards the HS chains of immobilized perlecan and, in case of platelets, also towards APAC, even in the absence of a classical platelet agonist such as collagen. Hence, one of the key functions of G6b-B *in vivo* may not be solely restricted to the inhibition of platelet function upon vascular injury, but may also retain platelets in a resting state by inhibiting other HS-binding platelet receptors, which remain to be identified. Notably, the HSPGs syndecan-1 and -4 are expressed on the surface of endothelial cells that form an integral part of the glycocalyx (Marki *et al.*, 2015). As platelets marginate to the vessel wall, the interaction of G6b-B on circulating platelets within the glycocalyx may induce a low level inhibitory signal that helps to maintain platelets in an inactive state, in line with the basal phosphorylation of G6b-B in resting platelets.

In summary, our findings establish the interaction of G6b-B with heparan sulfate as a novel mechanism regulating platelet reactivity, and demonstrate important implications of this interaction in the regulation of platelet production and the adverse effects upon soluble heparin administration.

Materials and methods

Key resources table

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Genetic reagent (<i>Mus musculus</i>)	<i>Mpig6b</i> ^{-/-}	PMID: 23112346		Dr. Yotis Senis (University of Birmingham and EFS Grand Est, Inserm UMR-S1255)
Genetic reagent (<i>M. musculus</i>)	<i>Mpig6b</i> ^{diYF/diYF}	PMID: 29891536		Dr. Yotis Senis (University of Birmingham and EFS Grand Est, Inserm UMR-S1255)
Cell line (<i>Cricetulus griseus</i>)	A5 CHO	other		provided by Dr. Ana Kasirer-Friede and Dr. Sanford Shattil (University of California, San Diego)
Antibody	anti-perlecan (rat monoclonal)	Santa Cruz Biotechnologies	clone A7L6; sc-33707; RRID: AB_627714	(1:100); used for IF staining of bone marrow (BM)
Antibody	anti-mouse CD105 (Endoglin) (rat monoclonal)	eBioscience/Thermo Fisher Scientific	#MA5-17943; clone MJ7/18; RRID: AB_2539327	(1:100); used for IF staining of BM
Antibody	anti-GPIX-Alexa488 (rat monoclonal)	other	clone 56F8	1.4 µg/ml; used for IF staining of BM, custom made lab reagent
Antibody	anti rat IgG Alexa 647 (goat polyclonal)	Invitrogen	#A-21247; RRID: AB_141778	(1:300); used for IF staining of BM

Continued on next page

Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Antibody	anti rat IgG Alexa 546 (goat polyclonal)	Invitrogen	#A-11081; RRID:AB_141738	(1:300); used for IF staining of BM
Antibody	anti-actin (mouse monoclonal)	Sigma-Aldrich	#A4700, clone AC-40; RRID:AB_476730	(1:1000)
Antibody	Anti- α -tubulin (mouse monoclonal)	Sigma-Aldrich	#T6199, clone DM1A; RRID:AB_477583	(1:1000)
Antibody	anti-GAPDH (rabbit monoclonal)	Cell Signaling Technology	#2118, clone: 14C10; RRID:AB_561053	(1:10) dilution, on 0.05 mg/ml lysates for Wes
Antibody	anti-Src p-Tyr418 (rabbit polyclonal)	Sigma-Aldrich	#44660G; RRID:AB_1500523	(1:10) dilution, on 0.05 mg/ml lysates for Wes
Antibody	anti-Shp1 p-Tyr564 (rabbit monoclonal)	Cell Signaling Technology	#8849, clone: D11G5; RRID:AB_11141050	(1:10) dilution, on 0.2 mg/ml lysates for Wes
Antibody	anti-Shp2 p-Tyr542 (rabbit polyclonal)	Cell Signaling Technology	#3751; RRID:AB_330825	(1:10) dilution, on 0.2 mg/ml lysates for Wes
Antibody	anti-Shp2 p-Tyr580 (rabbit polyclonal)	Cell Signaling Technology	#3703; RRID:AB_2174962	(1:10) dilution, on 0.2 mg/ml lysates for Wes
Antibody	anti-Syk p-Tyr525/6 (rabbit polyclonal)	Cell Signaling Technology	#2711; RRID:AB_2197215	(1:50) dilution, on 0.2 mg/ml lysates for Wes
Antibody	anti-SH-PTP1/Shp-1 (rabbit polyclonal)	Santa Cruz	sc-287 (C19); RRID:AB_2173829	(1:1000)
Antibody	anti-SH-PTP2/Shp-2 (rabbit polyclonal)	Santa Cruz	sc-280 (C18); RRID:AB_632401	(1:1000)
Antibody	anti-phosphotyrosine (mouse monoclonal)	Merck-Millipore	05-321, clone 4G10; RRID:AB_309678	(1:1000)
Antibody	anti-human G6b-B (mouse monoclonal)	other	clone 17-4	10 μ g/ml, custom-made lab reagent
Peptide, recombinant protein	purified human IgG-Fc fragment	Bethyl Laboratories	P80-104	
Peptide, recombinant protein	recombinant Mouse Syndecan-2/CD362 protein, CF	R&D Systems	6585-SD-050	
Peptide, recombinant protein	recombinant human Agrin protein, N-terminal, CF	R&D Systems	8909-AG-050	
Peptide, recombinant protein	rec. human laminin 111	Biolamina	LN111-02	
Peptide, recombinant protein	rec. human laminin 411	Biolamina	LN411-02	
Peptide, recombinant protein	rec. human laminin 421	Biolamina	LN421-02	
Peptide, recombinant protein	rec. human laminin 511	Biolamina	LN511-02	

Continued on next page

Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Peptide, recombinant protein	rec. human laminin 521	Biolamina	LN521-02	
Chemical compound, drug	heparan sulfate proteoglycan	Sigma-Aldrich	H4777	alternative name: perlecan
Chemical compound, drug	heparin	Iduron	HEP001	https://iduron.co.uk/product/Heparin-1
Chemical compound, drug	heparin oligosaccharide dp4	Iduron	HO04	https://iduron.co.uk/product/Heparin-1
Chemical compound, drug	heparin oligosaccharide dp8	Iduron	HO08	https://iduron.co.uk/product/Heparin-1
Chemical compound, drug	heparin oligosaccharide dp12	Iduron	HO12	https://iduron.co.uk/product/Heparin-1
Chemical compound, drug	heparin oligosaccharide dp20	Iduron	HO20	https://iduron.co.uk/product/Heparin-1
Chemical compound, drug	2-O-desulphated heparin	Iduron	DSH001/2	
Chemical compound, drug	6-O-desulphated heparin	Iduron	DSH002/6	
Chemical compound, drug	N desulphated heparin	Iduron	DSH003/N	
Chemical compound, drug	N-desulphated re N-acetylated heparin	Iduron	DSH004/Nac	
Chemical compound, drug	heparan sulphate	Iduron	GAG-HS01	
Chemical compound, drug	HS fraction III approx. mol. wt. 9 kDa	Iduron	GAG-HS III	
Chemical compound, drug	APAC	Aplagon Oy		
Chemical compound, drug	heparinase III (heparitinase I) <i>Flavobacterium heparinum</i> (EC 4.2.2.8)	AMSBiotechnology	AMS.HEP-ENZ III	
Chemical compound, drug	Heparin–biotin sodium salt	Sigma-Aldrich	B9806-10MG	
Chemical compound, drug	fibronectin	Cabiochem	Cat #341631	
Chemical compound, drug	fibrinogen	Enzyme Research Laboratories	Fib 3 3496L	
Chemical compound, drug	collagen I	Takeda	1130630	collagen reagens horns
Chemical compound, drug	Cultrex Mouse Collagen IV	Trevigen	3410-010-01	purchased via R & D Systems

Continued on next page

Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Chemical compound, drug	Laminin from EHS murine sarcoma basement membrane	Sigma-Aldrich	L2020	refers to mouse laminin-111 in this study
Chemical compound, drug	streptavidin	Sigma-Aldrich	S4762	
Software	Cell Profiler (2.2.0)	Broad Institute	http://cellprofiler.org/ RRID:SCR_007358	
Software	Fiji	PMID: 22743772	https://imagej.net/Fiji/ ; RRID:SCR_002285	

Mice

Mpig6b (*Mpig6b*^{-/-}) and *Mpig6b*^{diY/F} knock-in (*Mpig6b*^{diYF/diYF}) mice were generated on a C57BL/6 background by Taconic Artemis (Cologne, Germany) as previously described (Geer et al., 2018; Mazharian et al., 2012). Control mice were pure C57BL/6 (*Mpig6b*^{+/+}), referred to as WT. All procedures were undertaken with UK Home Office approval (project license No P46252127) in accordance with the Animals (Scientific Procedures) Act of 1986.

Reagents and antibodies

See Key Resources Table for information on the sources of key reagents used in this study.

p-nitrophenyl phosphate (pNPP) and goat anti-human IgG–HRP antibody were obtained from Sigma-Aldrich, Dorset, UK. The semisynthetic macromolecular conjugate of unfractionated heparin and a human serum albumin, APAC, was from Aplagon Oy, Helsinki, Finland. Blocking medium (2.5% horse serum) and 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) peroxidase substrate for immunohistochemistry were purchased from Vector Laboratories, Peterborough, UK and 3,3,5-tetramethylbenzidine (TMB) was from BD Biosciences, Wokingham, UK. Polyclonal phospho-specific G6b-B antibodies were generated by Biogenes, Berlin, Germany. Phalloidin-Alexa 488 was from Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK. All other antibodies and chemicals were either purchased or generated as previously described (Mazharian et al., 2012).

Constructs

Recombinant proteins: the cDNA encoding the mouse G6b-B extracellular domain was amplified by PCR using the primers GATC AAGCTT ATG GCC TTG GTC CTG CCG CTG (forward) and GATC GGATCC ACT TAC CTG T CTC GTA CCC GTG GGT AGA TCC (reverse) from a mouse megakaryocyte cDNA library template. The PCR product was cleaved using Hind III and Bam HI and ligated into pCDNA3lg, which was comprised of the genomic human IgG1 hinge-C2-C3 Fc region cloned into the HindIII and Not I sites of pCDNA3. This creates a construct encoding the extracellular part of G6b, spliced in frame with the IgG1 hinge, producing a G6b-B-Fc chimeric dimer. The resulting protein, mG6b-B-Fc, was expressed in COS-7 cells and then purified via affinity chromatography. The human G6b-B-Fc dimer (hG6b-B-Fc) construct was produced using an identical approach to the murine construct, using the primers GATC AAGCTT ATG GCT GTG TTT CTG CAG CTG (forward) and GATC GGATCC ACTTACCTGT CTG GGG ATA CAC GGA CCC ATG (reverse). Similarly, untagged monomeric G6b-B (residues 18–142) as well as His-tagged versions were produced — human G6b-B (residues 18–142)-Fc-His6 (expressed as a homodimer) and human G6b-B (residues 18–142)-Fc-His6/Fc-streptagII (heterodimer, monomeric for G6b-B; Peak Proteins Limited, Alderley Park) — for use in surface plasmon resonance measurements. All human constructs were expressed transiently in HEK293-6E cells.

Cell culture: The cDNA encoding the full length of human G6b-B protein was amplified by PCR from a human cDNA library. This PCR fragment was first cloned into the pCR-Blunt vector (Invitrogen), and then subcloned into the pCDNA3 vector, for the expression of untagged G6b-B in heterologous cell systems. Subsequently, the G6b-B mutant that is mutated in the potential heparin

binding site (hG6b-B K54D/K58D/R60E/R61E) was generated with the Quick Change Site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, Stockport, UK).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry stainings were performed according to standard protocols. In brief, frozen mouse tissue sections (Zyagen, San Diego, CA, USA) were thawed and washed once in phosphate buffered saline (PBS). After blocking for 20 min (min) at room temperature (RT), tissues were incubated with mG6b-B-Fc or human IgG-Fc fragment (negative control, 5 µg/ml in PBS) for 75 min at RT. After three washing steps in PBS, slides were fixed in acetone/PFA for 4 min and endogenous peroxidase was blocked with 3% H₂O₂ in methanol (5 min). Slides were incubated with anti-human IgG–HRP antibody (1:600 in PBS, 0.1% Tween 20) and the signal developed with DAB substrate. Subsequently, tissue sections were counterstained with hematoxylin. Images were acquired on a Zeiss Axio Scan.Z1 (Zeiss, Cambridge, UK) equipped with a 3CCD color 2MP Hitachi 1200 × 1600 HV-F202SCL camera, using a 10x (NA 0.45) or 20x (NA 0.8) plan apochromat air objective. Images were acquired and exported with the Zeiss Zen software.

Femur sectioning and staining

Femurs of mice aged 6–12 weeks were sectioned and stained as described previously (Kawamoto, 2003; Semeniak et al., 2016). In brief, femora were isolated, fixed for 4 hr at 4°C in 4% PFA before being transferred along a sucrose gradient from 10%, 20% and 30%, each for 24 hr. Next, femora were embedded in SCEM medium (Section lab, Hiroshima, Japan) and frozen at –80°C until sectioning. Megakaryocytes were stained with anti-GPIX-Alexa488 antibody, and CD105 was used as an endothelial cell marker. Additional stainings were performed using antibodies against perlecan. Corresponding secondary antibodies were used at a 1:300 dilution. Slides were mounted in Fluoromount G including DAPI (Thermo Fisher Scientific). Recording was performed using a Leica TCS SP8 confocal laser scanning microscope (Leica, Wetzlar, Germany) with an 40x oil objective at 20°C. The numerical aperture (NA) of the objective lens was 1.3 and the software used for data acquisition was LAS X (Leica). Subsequently, images were processed with ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). No 3D reconstruction, gamma adjustments or deconvolution were performed.

For reconstruction of whole femora sections, single images were taken with a resonant scanner and digitally stitched using LAS X software.

Electron microscopy studies

Bone marrow samples obtained by flushing mouse femora with 0.1 M sodium cacodylate buffer were fixed in 2.5% glutaraldehyde and embedded in Epon as described (Eckly et al., 2012). Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined under a JEOL 2100Plus transmission electron microscope at 120 kV (Jeol, Tokyo, Japan). Megakaryocytes were counted on whole transversal sections and the number of cells was expressed as a density per unit area (defined as one square of the grid, i.e. 13 000 µm²). Megakaryocytes at stages I, II and III were identified using distinct ultrastructural characteristics: stage I, a cell 10–50 µm in diameter with a large nucleus; stage II, a cell 20–80 µm in diameter containing platelet-specific granules; stage III, a megakaryocyte containing a well-developed demarcation membrane system defining cytoplasmic territories and a peripheral zone. Samples from three mice of each genotype were examined in each case.

Pull-down and identification of the ligand

Venae cavae were dissected from wild-type mice and fat and connective tissue were removed. The endothelial tissue was placed in lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% IGEPAL CA-630, 5 mM Na₃VO₄, 0.5 mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin, 0.5 µg/ml pepstatin) and homogenized with a PowerGen homogenizer (Fisher Scientific, Loughborough, UK). Lysates were centrifuged at 13,000 × g for 10 min at 4°C. Supernatants were collected and re-centrifuged under the same conditions. Protein lysate was precleared with Protein G sepharose (PGS, 50% slurry) and human IgG-Fc fragment by agitation for 1 hr at 4°C. The lysate was then split into two samples which received either mG6b-B-Fc or human IgG-Fc fragment (negative control). After 1.5 hr, PGS was added and samples were agitated for another 1.5 hr at 4°C. Finally, PGS was washed three times in lysis buffer

and bound proteins were eluted by boiling the PGS pellet for 5 min in 40 μ l 2x SDS sample buffer. Samples were then resolved on a NuPage 4–12% Bis-Tris-Gradient Gel (Invitrogen), alongside mG6b-B-Fc (additional negative control) and stained with colloidal coomassie. Bands appearing in the mG6b-B-Fc pulldown, but not in the negative controls, were excised and subjected to mass spectrometry analysis (Orbitrap, Thermo Fisher Scientific, Paisley, UK). Corresponding areas from the control pulldown were cut and analyzed in parallel to account for background signals.

In vitro binding assay

Nunc MaxiSorp plates (Thermo Fisher Scientific) were coated overnight with 50 μ l of substrates, diluted in PBS (supplemented with 0.9 mM CaCl_2 and 0.5 mM MgCl_2 for laminins) at a concentration of 5 μ g/ml. Plates were washed three times with Tris buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) and blocked for 1.5 hr at 37°C with 2% fat free milk in TBS and 0.02% Tween 20. For heparin immobilization, biotinylated heparin (5 μ g/ml) was added to streptavidin-coated wells for 1 hr at RT prior to the blocking step. After one washing step, recombinant G6b-B-Fc or human IgG-Fc fragment (negative control) in 3% BSA in TBS-T was added and incubated for 2 hr at 37°C. In competition assays, this incubation step was performed in the presence of the indicated compound. After five washing steps, wells were incubated with HRP-conjugated anti-human IgG antibody for 1 hr at RT at low agitation. Alternatively, monomeric, untagged G6b-B was incubated with anti-G6b-B antibody, and bound complexes were detected with HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody. Plates were washed seven times and the signals were developed with TMB. The reaction was stopped by the addition of 2 M H_2SO_4 (50 μ l/well) and absorbance at 450 nm and 570 nm (background) was measured with a Versa max plate reader (Molecular Devices, Wokingham, UK).

Genome-wide cell-based genetic screening

The cell-based genome-wide genetic screen was performed essentially as described (*Sharma et al., 2018*). In brief, 3×10^7 Cas9-expressing HEK293 cells were transduced with a library of lentiviruses, each encoding a single gRNA from a pool of 90,709 individual gRNAs targeting 18,009 human genes at a low multiplicity of infection of 0.3 to increase the chances that each cell received a single gRNA. Ten million lentivirally transduced cells were selected using a blue fluorescent protein (BFP) marker three days after transduction using fluorescence-activated cell sorting. The sorted cells were placed back into culture and further selected for five days with 2 μ g/mL puromycin. On day nine post transduction, 100×10^6 cells were stained with a recombinant protein consisting of the entire ectodomain of biotinylated human G6b-B clustered around phycoerythrin (PE)-conjugated streptavidin for an hour at room temperature. The cells were sorted using an XDP flow sorter and the BFP⁺/PE⁻ population collected, representing ~1% of the total cell population. A total of 600,000 cells were collected from which genomic DNA was extracted, and gRNA sequences were amplified by PCR before their abundances were determined by next generation sequencing. The enrichment of gRNA sequences targeting specific genes in the sorted versus unsorted populations were quantified from the sequence data using MAGeCK software (*Li et al., 2014*) as previously described (*Sharma et al., 2018*).

FGFRL1 was used as a positive control for testing the KO of SLC35B2, as it is known to interact with heparan sulfate (*Trueb, 2011*). Both G6b-B and FGFRL1 were produced as biotinylated proteins in HEK293 cells by co-transfection with a plasmid encoding a secreted form of the *Escherichia coli* biotin ligase, BirA (*Bushell et al., 2008*). The ectodomain of FGFRL1, aa 1–378, was subcloned from the Origene plasmid sc123844 by PCR with KOD enzyme and primers containing the Not-Ascl restriction sites, and cloned into an expression vector containing a rat Cd4 domains 3 and 4 (CD3+4) tag and biotinylatable sequence. Avid fluorescent binding forms of the proteins were generated by conjugating the biotinylated recombinant ectodomain of FGFRL1 with streptavidin-PE. Parental and cells in which SLC35B2 was targeted were stained with the fluorescent reagent as described before (*Sharma et al., 2018*).

Surface plasmon resonance

The interaction of the recombinant heterodimeric ('monomer') and homodimeric ('dimer') human G6b-B extracellular domain with different ligands was quantified using a BIAcoreTM 8K instrument (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Recombinant G6b-B proteins were immobilized on CM5 sensor

chips (GE Healthcare) via an Fc antibody using the Human Antibody Capture Kit (GE Healthcare). Immobilization levels ranged from 7800 to 9000 response units (RU) for the Fc antibody and 3000 to 4000 RU for the G6b-B proteins. Single cycle kinetics (SCK) measurements were undertaken with perlecan, heparin, fractionated HS and dp12. The analytes were injected in increasing concentrations of 0.1, 1, 10, 100 and 1000 nM. Analytes were flowed over the immobilized G6b-B surface at 30 μ l/min with 60 s injection time and 60 s dissociation per concentration. In the 'reversed configuration', biotinylated heparin, HS and perlecan were immobilized on streptavidin sensor chips (GE Healthcare); fractionated HS and perlecan were biotinylated using the Lightning-Link Biotinylation kit (Innova Biosciences, Cambridge, UK). Immobilization levels of the biotinylated species were between 900 and 1000 RU. The SCK of 'monomeric' and 'dimeric' G6b-B were evaluated at 0.05, 0.5, 5, 50 and 500 nM. The analytes were flowed over the immobilized peptides at 10 μ l/min with 180 s injection time and 360 s dissociation at each concentration. Data were collected from two replicates per experiment type and analyzed using the BIA evaluation software (GE Healthcare). Sensorgrams were double referenced prior to global fitting the SCK sensorgrams to one-to-one binding models in order to determine the rate constant of association (k_{on}) and dissociation (k_{off}). Binding affinities (K_D) were calculated from the equation $K_D = k_{off}/k_{on}$.

Theoretical modeling of G6b-B structure

The G6b-B ectodomain model was generated by submitting the amino acid sequence for G6b-B residues 18–142 to the RaptorX Structure Prediction server (<http://raptorx.uchicago.edu/>) (Källberg *et al.*, 2012). Subsequent modeling of the K54D, K58D, R60E, R61E G6b-B mutants and all molecular graphics figure generation was carried out using PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.). The electrostatic surfaces of both wild-type and mutant G6b-B models were calculated using the APBS suite (Jurrus *et al.*, 2018).

Crystallography

Production of recombinant G6b-B and the anti-G6b-B Fab fragment. The G6b-B extracellular domain (ECD) construct encompassing residues 18–133 which include the mutations N32D, S67A, S68A, S69A, T71A was expressed in mammalian HEK293 cells and purified by cation exchange and size-exclusion chromatography. The N32D mutation was used to remove the single potential N-linked glycosylation site that we showed by SDS-PAGE and mass spectrometry to be partially utilized. Intact mass spectrometry also revealed that after having made the N32D mutation, the measured mass of the protein was 948 Da greater than expected, a mass that is consistent with a common O-linked oligosaccharide, 2x sialic acid, galactose, N-acetyl galactosamine. The O-glycosylation was located using TOF-mass spectrometry of a chymotryptic digest of a region encompassing residues 66–80 with the sequence ASSSGTPTVPPLQPF. Each of the five potential sites was mutated to Ala individually in tandem with N32D. This showed that the predominant site was T73, although other Ser or Thr residues could be modified to a lesser degree. Finally, two constructs were made and tested for crystallization, one with four residues mutated to Ala but leaving T73 and one with all five residues mutated to Ala. The construct with four changes crystallized more readily and enabled us to solve the structure. The recombinant anti-G6b-B Fab fragment was also produced in HEK cells, synthetic genes for light and heavy chains were obtained from Invitrogen GeneArt. The G6b-B ECD-Fab complex was formed by incubating the components together for 2 hr at room temperature with G6b-B ECD in a 1.5 molar excess, and the complex was subsequently purified by size-exclusion chromatography. Protein was concentrated to 12 mg/ml in 20 mM Hepes (pH 7.1) and 75 mM NaCl, and finally incubated with 2 mM (10-fold molar excess) of the heparin oligosaccharide dp12 for 1 hr at 4°C prior to setting up the crystallization experiment.

Production of crystals and solving of structure. Crystals were grown by vapor diffusion at 20°C in 50 mM MES (pH 6.2), 10% PEG 550MME, 5% v/v glycerol, and 50 mM CaCl₂, and appeared within 3 days. Crystals were harvested straight out of the growth drop and cryo-cooled in liquid nitrogen. X-ray diffraction data were collected at 100K on beamline I03 at Diamond Light Source and processed using XDS (Kabsch, 2010) and Aimless (Evans and Murshudov, 2013) via AutoPROC (Vonrhein *et al.*, 2011). The crystal was in space group C2 with the cell dimensions of a = 183.80 Å, b = 72.34 Å, c = 131.04 Å, β = 124.52°, and extended to 3.1 Å resolution (Table 2).

The structure was initially solved by molecular replacement using the program Phaser (*McCoy et al., 2007*) and with a model of the Fab fragment generated from the PDB structure 4K2U (*Chen et al., 2013*) as the search model. This resulted in the placement of two Fab molecules in the asymmetric unit (Phaser Z-score after translation search = 10.2). Examination of the resulting electron density maps showed substantial unmodeled density in the vicinity of the CDR regions of both Fab molecules, which were interpreted as bound G6b-B ECD. Multiple rounds of model building in Coot (*Emsley and Cowtan, 2004*) and refinement using Refmac5 (*Murshudov et al., 1997*) resulted in a model encompassing about 90% (101 out of 116 residues) of the G6b-B ECD chain. Residual density at that stage was identified as a single molecule of dp12-bound heparin, with the density covering 8 of the 12 saccharide units in dp12.

The final model represents a complex of G6b-B ECD, dp12 and Fab fragment chains in the ratio 2:1:2, respectively. The refined structure of G6b-B ECD chain has observable electron density for residues Pro19 to Thr38, Arg43 to Arg83 and Ile91 to Cys129. The G6b-B ECD, as expected, is shown to be a member of the IgV superfamily, with the solved structure comprising two antiparallel β -sheets formed by strands ABDE and A'CC'FG. There is also evidence from the electron density for O-linked glycosylation at Thr73 in both copies of the G6b-B ECD. Final refinement statistics for the G6b-B ECD-dp12-Fab dimer complex are given in **Table 2**.

Size chromatography of G6b-B ECD

The G6b-B ECD protein encompassing residues 18–133 (N32D, S67A, S68A, S69A, T71A) was either analyzed immediately, or after incubation with heparin oligosaccharide dp12. A Superdex 75 10/300 GL column (GE Healthcare) was both equilibrated and run in 20 mM Hepes (pH 7.1) and 75 mM NaCl. dp12 was added to the G6b-B ECD at a 4-fold molar excess (150 μ M final concentration). After the addition of dp12, the sample was aspirated gently and incubated for 90 min on ice, prior to SEC analysis. Columns were run at 0.3 ml/min, and 400 μ l of G6b-B ECD samples were loaded (200 μ g). A calibration curve was prepared in the same buffer using conalbumin (75 kDa), ovalbumin (44 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), ribonuclease A (13.7 kDa) and aprotinin (6.6 kDa) (LMM gel filtration standard kit, GE Healthcare). This calibration curve was then used to estimate the molecular weight of both G6b-B ECD and G6b-B ECD +dp12 in order to determine their polymeric states.

Flow-cytometric analysis of heparin binding in transfected CHO cells

A5 CHO cells were kindly provided by Ana Kasirer-Friede and Sanford Shattil (University of California, San Diego). A test for mycoplasma contamination was negative. Transfections of WT or mutant hG6b-B into CHO cells were carried out in 6-well plates (3×10^5 cells in 2 ml DMEM medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine) using polyethylenimine (Sigma-Aldrich) as described (*Ehrhardt et al., 2006*). Cells were harvested 2 days after transfection by detaching them with accutase, and resuspended in PBS containing 0.2 mg/ml BSA and 0.02% sodium azide. Cells were incubated with heparin-biotin (10 μ g/ml) and mouse anti-human G6b-B antibody for 45 min at RT, washed twice, and incubated with streptavidin-PE (BD Biosciences) and anti-mouse-alexa488 antibody (Invitrogen). Cells were fixed with 1% formaldehyde and analyzed on a BD FACSCalibur (BD Biosciences).

Aggregometry

Platelet rich plasma (PRP) was prepared from blood collected from healthy drug-free volunteers as described previously (*Dawood et al., 2007*). Donors gave full informed consent according to the Helsinki declaration. Ethical approval for collecting blood was granted by Birmingham University Internal Ethical Review (ERN_11–0175 and ERN_15–0973). In brief, 9 volumes of blood were collected into 1 vol of 4% (w/v) sodium citrate solution. Blood was centrifuged at $200 \times g$ for 20 min at RT and PRP was collected. Platelet aggregation was measured using a lumi-aggregometer (Chrono-Log, Abingdon on Thames, UK, Model 700).

Platelet adhesion assay

This assay was performed as described previously (*Bellavite et al., 1994*). In brief, Nunc MaxiSorp plates were coated overnight with 50 μ l of substrates, diluted in PBS at a concentration of 10 μ g/ml, except for collagen which was used at 2.5 μ g/ml. Plates were then washed three times and blocked

with 2% BSA in PBS for 1 hr at 37°C. After washing, 50 μ l heparinase III (5 mU/ml) or buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mg/ml BSA and 4 mM CaCl_2) were added to each well and incubated for 1.5 hr. After three washing steps, 50 μ l of platelet suspension modified Tyrode's buffer, prepared as previously described (Pearce *et al.*, 2004), at a concentration of 1×10^8 /ml were added and incubated for 1 hr at 37°C. After three washing steps with PBS, 140 μ l of substrate solution was added to each well and incubated on a rocker at RT for 40 min. Then, 50 μ l of 3M NaOH was added and the signal was quantified 5 min later by measuring the absorbance at 405 nm and 620 nm (background). Percentage of adhesion was calculated by normalizing the measured ODs to the signal obtained by directly lysing 50 μ l of platelet suspension.

Flow cytometric analysis of platelet activation

5 μ l staining solution, containing 1.5 μ g fibrinogen-Alexa488 conjugate (Invitrogen) and 1 μ g of anti-TLT-1-Alexa 647 antibody (Biotechne, Abingdon, UK) and 5 μ l of whole blood were provided in a well of a 96-well plate. Stimulation was started by adding 40 μ l of heparin, APAC (0.05 μ M final concentration) or buffer, with or without CLEC-2 antibody (3 μ g/ml final concentration; Bio-Rad, Oxford, UK). The plate was incubated in the dark for the indicated time and the reaction was stopped by addition of 200 μ l 1% ice-cold formalin. Samples were analyzed on a BD Accuri flow cytometer. Platelets were gated using forward and side scatter.

Preparation and culture of mouse megakaryocytes

Megakaryocytes were prepared as previously described (Dumon *et al.*, 2006; Mazharian *et al.*, 2011). In brief, bone marrow cells were obtained from mouse femurs and tibias by flushing, and cells expressing lineage-specific surface markers (CD16/CD32, Gr1, B220, or CD11b) were depleted using immunomagnetic beads (sheep anti-rat IgG Dynabeads, Invitrogen). The remaining population was cultured in 2.6% serum-supplemented StemPro medium with 2 mM L-glutamine, penicillin/streptomycin, and 20 ng/mL of murine stem cell factor at 37°C under 5% CO_2 for 2 days, and for a further 4 days in the presence of stem cell factor and 50 ng/mL thrombopoietin (37°C, 5% CO_2). Mature megakaryocytes were then enriched using a 1.5%/3% bovine serum albumin gradient under gravity (1 g) for 45 min at room temperature.

Microscopical analysis of platelet and MK adhesion

Glass Coverslips (5 mm diameter) were incubated with 50 μ l of perlecan (25 μ g/ml), fibrinogen (25 μ g/ml) or both overnight at 4°C. Surfaces were then blocked with denatured BSA (5 mg/ml) for 1 hr at room temperature. After washing, 50 μ l heparinase III (12.5 mU/ml) or buffer were added to each well and incubated for 1.5 hr at 37°C. Platelets (2×10^7 /ml, 50 μ l) were transferred to the slides and incubated at 37°C for 45 min in a humid atmosphere. Mature megakaryocytes (6×10^3 /ml, 100 μ l) were incubated for 5 hr. Non-adherent cells were removed by gently washing wells with PBS and adherent cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde and permeabilized with 0.2% Triton-X 100 in water. MKs were stained with tubulin-antibody for 1 hr followed by anti-mouse-Alexa-488 and rhodamin-conjugated phalloidin for 30 min, and coverslips were mounted onto microscope slides for imaging using or Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen). Platelets were stained with phalloidin-Alexa-488 for 1 hr and coverslips were mounted using Hydromount (National Diagnostics, Nottingham, UK). Images were captured by a Zeiss Axio Observer.Z1/7 epifluorescence microscope using ZEN Software and 20x (MK) or 63x oil immersion (platelet) plan apochromat objectives.

For platelets, each coverslip was imaged in three random areas. For analysis, the central quarter of each field of view was cropped (1024 \times 1024 pixels) and ilastik pixel classifier software was used to outline a binary segmentation (Sommer *et al.*, 2011). To distinguish touching platelets, KNIME analytic platform was used to identify the centre of individual platelets manually (Berthold *et al.*, 2009). These coordinates were used to produce the final segmentation of individual platelets, and platelet size was subsequently calculated.

For MK, three tiles of 3 \times 3 images were acquired per coverslip. Average surface area per cell was calculated by analyzing total surface area and number of cells per image by using ImageJ. Both, imaging and analysis were performed blinded.

Western blotting and immunoprecipitation

Washed human or mouse platelets (5×10^8 /ml) in the presence of 10 μ M integrilin or lotrafiban (integrin α IIb β 3 inhibitors), respectively, were incubated with the respective compound under stirring conditions (1200 rpm, 37°C) for the indicated time. Platelets were lysed by the addition of an equal volume of ice cold 2 x lysis buffer and insoluble cell debris was removed by centrifugation for 10 min at 13,000 x g, at 4°C.

For immunoprecipitations, whole cell lysates (WCLs) were precleared using protein A Sepharose (Sigma-Aldrich) for 30 min at 4°C. G6b-B was immunoprecipitated from collagen-WCLs with anti-G6b-B antibody and protein A sepharose overnight at 4°C as previously described (*Mazharian et al., 2012*).

WCLs were either boiled in SDS-loading buffer and analyzed by SDS-PAGE (NuPage 4–12% Bis-Tris-Gradient Gel) and traditional western blotting or, for quantitative analysis, analyzed with an automated capillary-based immunoassay platform (Wes, ProteinSimple, San Jose, USA), according to the manufacturer's instructions. Briefly, WCLs were diluted to the required concentration with 0.1X sample buffer, then prepared by adding 5X master mix containing 200 mM dithiothreitol (DTT), 5 x sample buffer and fluorescent standards (Standard Pack 1, PS-ST01-8) and boiled for 5 min at 95°C. Samples, antibody diluent 2, primary antibodies and anti-rabbit secondary antibody, together with luminol S-peroxide mix and wash buffer, were displaced into Wes 12–230 kDa prefilled microplates (pre-filled with separation matrix 2, stacking matrix 2, split running buffer two and matrix removal buffer, SM-W004). The microplate was centrifuged for 5 min at 2500 rpm at room temperature. To start the assays, the capillary cartridge was inserted into the cartridge holder and the microplate placed on the plate holder. To operate Wes and to analyze results, Compass Software for Simple Western was used (version 3.1.7, ProteinSimple). Separation time was set to 31 min, stacking loading time to 21 s and sample loading time to 9 s. Primary antibodies were incubated for 60 min and the High Dynamic Range (HDR) profile was used for detection. For each antibody, a lysate dilution experiment was performed first to confirm the optimal dynamic range of the corresponding protein on Wes. This was followed by an antibody optimization experiment to compare a range of dilutions and to select an antibody concentration that was close to saturation level to allow a quantitative comparison of signals between samples. The optimized antibody dilutions and final lysate concentrations were as indicated in the key resources table.

Statistical analysis

All data are presented as mean \pm standard deviation (SD). Statistical significance was analyzed by one-way or two-way ANOVA, followed by the appropriate post hoc test, as indicated in the figure legend, using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

Acknowledgements

The authors would like to thank all of the voluntary blood donors and the phlebotomists as well as Jamie Webster from the University of Birmingham Core Protein Expression Facility and Silke Heising for excellent technical assistance, Jeremy A Pike for assistance with image and KNIME analysis, the Advanced Mass Spectrometry Facility, and all members of the Biomedical Services Unit for exceptional maintenance of the mouse colonies.

Additional information

Competing interests

Jordan Lane: was an employee at Sygnature Discovery Limited at the time of the study, performing surface plasmon resonance experiments as part of a paid service. Scott Pollack: is an employee at Sygnature Discovery Limited, performing surface plasmon resonance experiments as part of a paid service. Riitta Lassila: is CSO and shareholder of Aplagon Oy, Helsinki, Finland. Annukka Jouppila: receives research funding from Aplagon Oy, Helsinki, Finland. Derek J Ogg, Tina D Howard, Helen J McMiken, Juli Warwicker, Catherine Geh: is an employee at Peak proteins Limited, performing crystallography and protein expression studies as part of a paid service. Rachel Rowlinson: is employee

at Peak proteins Limited, performing crystallography and protein expression studies as part of a paid service. W Mark Abbott: is CEO of Peak proteins Limited, performing crystallography and protein expression studies as part of a paid service. The other authors declare that no competing interests exist.

Funding

Funder	Grant reference number	Author
British Heart Foundation	RG/15/13/31673	Jun Mori Zoltan Nagy Alexandra Mazharian Yotis A Senis
British Heart Foundation	FS/13/1/29894	Yotis A Senis
Deutsche Forschungsgemeinschaft	VO 2134-1/1	Timo Vögtle
Medical Research Council	Confidence in Concept 2018	Timo Vögtle Yotis A Senis
Wellcome	206194	Gavin J Wright
British Heart Foundation	FS/15/58/31784	Alexandra Mazharian
Agence Nationale de la Recherche	ANR-17-CE14-0001-01	Anita Eckly

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

Timo Vögtle, Formal analysis, Funding acquisition, Validation, Investigation, Methodology, Writing—original draft, Writing—review and editing; Sumana Sharma, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing—review and editing; Jun Mori, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Writing—review and editing; Zoltan Nagy, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing—original draft, Writing—review and editing; Daniela Semeniak, Cyril Scandola, Mitchell J Geer, Juli Warwicker, Anita Eckly, Michael R Douglas, Investigation, Writing—review and editing; Christopher W Smith, Helen J McMiken, Catherine Geh, Rachel Rowlinson, Investigation; Jordan Lane, Scott Pollack, Investigation, Methodology, Writing—original draft; Riitta Lassila, Annukka Jouppila, Resources, Writing—review and editing; Alastair J Barr, Methodology, Writing—review and editing; Derek J Ogg, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing—review and editing; Tina D Howard, Supervision, Investigation; W Mark Abbott, Formal analysis, Supervision, Methodology; Harald Schulze, Formal analysis, Writing—review and editing; Gavin J Wright, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Writing—original draft, Writing—review and editing; Alexandra Mazharian, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Writing—review and editing; Klaus Fütterer, Formal analysis, Validation, Investigation, Methodology, Writing—original draft; Sundaresan Rajesh, Formal analysis, Investigation; Yotis A Senis, Conceptualization, Resources, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Validation, Investigation, Methodology, Writing—original draft, Project administration, Writing—review and editing

Author ORCIDs

Timo Vögtle  <https://orcid.org/0000-0002-9400-4701>
 Sumana Sharma  <https://orcid.org/0000-0003-0598-2181>
 Jun Mori  <http://orcid.org/0000-0002-6212-1604>
 Zoltan Nagy  <https://orcid.org/0000-0001-6517-2071>
 Mitchell J Geer  <https://orcid.org/0000-0003-1457-987X>
 Scott Pollack  <https://orcid.org/0000-0002-8176-0997>
 Riitta Lassila  <https://orcid.org/0000-0002-1911-3094>
 Alastair J Barr  <http://orcid.org/0000-0001-7738-8419>

Derek J Ogg  <https://orcid.org/0000-0002-7751-5913>
 Harald Schulze  <https://orcid.org/0000-0003-1285-6407>
 Gavin J Wright  <http://orcid.org/0000-0003-0537-0863>
 Alexandra Mazharian  <https://orcid.org/0000-0002-0204-3325>
 Klaus Fütterer  <https://orcid.org/0000-0001-7445-5372>
 Yotis A Senis  <https://orcid.org/0000-0002-0947-9957>

Ethics

Human subjects: Blood was collected from healthy drug-free volunteers. Donors gave full informed consent according to the Helsinki declaration. Ethical approval for collecting blood was granted by Birmingham University Internal Ethical Review (ERN_11-0175 and ERN_15-0973).

Animal experimentation: All animal procedures were undertaken with the U.K. Home Office approval (project license No P46252127) in accordance with the Animals (Scientific Procedures) Act of 1986.

Decision letter and Author response

Decision letter <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.059>

Author response <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.060>

Additional files

Supplementary files

- Transparent reporting form

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.46840.041>

Data availability

Diffraction data have been deposited in PDB under the accession code 6R0X.

The following dataset was generated:

Author(s)	Year	Dataset title	Dataset URL	Database and Identifier
Timo Vögtle, Sumana Sharma, Jun Mori, Zoltan Nagy, Daniela Semeniak, Cyril Scandola, Mitchell J Geer, Christopher W Smith, Jordan Lane, Scott Pollack, Riitta Lassila, Annukka Jouppila, Alastair J Barr, Derek J Ogg, Tina D Howard, Helen J McMillen, Juli Warwicker, Catherine Geh, Rachel Rowlinson, W Mark Abbott, Anita Eckly, Harald Schulze, Gavin J Wright, Alexandra Mazharian, Klaus Fütterer, Sundaresan Rajesh, Michael R Douglas, Yotis A Senis	2019	G6b-B in complex with dp12	http://www.rcsb.org/structure/6R0X	Protein Data Bank, 6R0X

The following previously published datasets were used:

Author(s)	Year	Dataset title	Dataset URL	Database and Identifier
Cai Z, Yarovoi S V, Zhu Z, Rauova L,	2015	Crystal structure of platelet factor 4 complexed with fondaparinux	https://www.rcsb.org/structure/4R9W	Protein Data Bank, 4R9W

Hayes V, Lebedeva T, Liu Q, Poncz M, Arepally G, Cines D B, Greene M I

Dahms S O, Mayer M C, Roeser D, Multhaup G, Than M E	2015	X-ray structure of the amyloid precursor protein-like protein 1 (aplp1) e2 domain in complex with a heparin dodecasaccharide	https://www.rcsb.org/structure/4RDA	Protein Data Bank, 4RDA
Fukuhara N, Howitt J A, Hussain S A, Hohenester E	2008	Drosophila Robo IG1-2 (monoclinic form)	https://www.rcsb.org/structure/2VRA	Protein Data Bank, 2VRA
Pellegrini L, Burke D F, von Delft F, Mulloy B, Blundell T L	2000	Crystal structure of a ternary fgf1-fgfr2-heparin complex	https://www.rcsb.org/structure/1E00	Protein Data Bank, 1E00
Schlessinger J, Plotnikov A N, Ibrahim O A, Eli-seenkova A V, Yeh B K, Yayon A, Linhardt R J, Mohammadi M	2000	Crystal structure of a ternary fgf2-fgfr1-heparin complex	https://www.rcsb.org/structure/1FQ9	Protein Data Bank, 1FQ9

References

- Abbott DW**, van Bueren AL. 2014. Using structure to inform carbohydrate binding module function. *Current Opinion in Structural Biology* **28**:32–40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.07.004>, PMID: 25108190
- Battaglia C**, Mayer U, Aumailley M, Timpl R. 1992. Basement-membrane heparan sulfate proteoglycan binds to laminin by its heparan sulfate chains and to nidogen by sites in the protein core. *European Journal of Biochemistry* **208**:359–366. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17195.x>, PMID: 1521532
- Bellavite P**, Andrioli G, Guzzo P, Arigliano P, Chirumbolo S, Manzato F, Santonastaso C. 1994. A colorimetric method for the measurement of platelet adhesion in microtiter plates. *Analytical Biochemistry* **216**:444–450. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1066>, PMID: 8179202
- Bergmeier W**, Hynes RO. 2012. Extracellular matrix proteins in Hemostasis and thrombosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **4**:a005132. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005132>, PMID: 21937733
- Berthold MR**, Cebren N, Dill F, Gabriel TR, Kötter T, Meil T, Ohl P, Thiel K, Wiswedel B. 2009. KNIME-the Konstanz information miner: version 2.0 and beyond. *AcM SIGKDD Explorations Newsletter* **11**:26–31. DOI: <https://doi.org/10.1145/1656274.1656280>
- Bix G**, Iozzo RA, Woodall B, Burrows M, McQuillan A, Campbell S, Fields GB, Iozzo RV. 2007. Endorepellin, the C-terminal angiostatic module of Perlecan, enhances collagen-platelet responses via the alpha2beta1-integrin receptor. *Blood* **109**:3745–3748. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-039925>, PMID: 17197432
- Boraston AB**, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ. 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal* **382**:769–781. DOI: <https://doi.org/10.1042/BJ20040892>, PMID: 15214846
- Brändén C-I**, Tooze J. 2009. *Introduction to Protein Structure*. New York, NY: Garland Pub.
- Bushell KM**, Söllner C, Schuster-Boeckler B, Bateman A, Wright GJ. 2008. Large-scale screening for novel low-affinity extracellular protein interactions. *Genome Research* **18**:622–630. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.7187808>, PMID: 18296487
- Bye AP**, Unsworth AJ, Gibbins JM. 2016. Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **14**:918–930. DOI: <https://doi.org/10.1111/jth.13302>, PMID: 26929147
- Cai Z**, Yarvoiv SV, Zhu Z, Rauova L, Hayes V, Lebedeva T, Liu Q, Poncz M, Arepally G, Cines DB, Greene MI. 2015. Atomic description of the immune complex involved in heparin-induced thrombocytopenia. *Nature Communications* **6**:8277. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms9277>
- Chandarajoti K**, Liu J, Pawlinski R. 2016. The design and synthesis of new synthetic low-molecular-weight heparins. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **14**:1135–1145. DOI: <https://doi.org/10.1111/jth.13312>, PMID: 26990516
- Chen E**, Paing MM, Salinas N, Sim BK, Tolia NH. 2013. Structural and functional basis for inhibition of erythrocyte invasion by antibodies that target plasmodium falciparum EBA-175. *PLOS Pathogens* **9**:e1003390. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003390>, PMID: 23717209
- Cooney MF**. 2006. Heparin-induced thrombocytopenia: advances in diagnosis and treatment. *Critical Care Nurse* **26**. PMID: 17123949
- Coxon CH**, Geer MJ, Senis YA. 2017. ITIM receptors: more than just inhibitors of platelet activation. *Blood* **129**:3407–3418. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2016-12-720185>, PMID: 28465343
- Dahms SO**, Mayer MC, Roeser D, Multhaup G, Than ME. 2015. Interaction of the amyloid precursor protein-like protein 1 (APLP1) E2 domain with heparan sulfate involves two distinct binding modes. *Acta Crystallographica*

- Section D *Biological Crystallography* **71**:494–504. DOI: <https://doi.org/10.1107/S1399004714027114>, PMID: 25760599
- Dawood BB, Wilde J, Watson SP. 2007. Reference curves for aggregation and ATP secretion to aid diagnose of platelet-based bleeding disorders: effect of inhibition of ADP and thromboxane A(2) pathways. *Platelets* **18**: 329–345. DOI: <https://doi.org/10.1080/09537100601024111>, PMID: 17654303
- de Vet EC, Newland SA, Lyons PA, Aguado B, Campbell RD. 2005. The cell surface receptor G6b, a member of the immunoglobulin superfamily, binds heparin. *FEBS Letters* **579**:2355–2358. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.03.032>, PMID: 15848171
- Dumon S, Heath VL, Tomlinson MG, Göttgens B, Frampton J. 2006. Differentiation of murine committed megakaryocytic progenitors isolated by a novel strategy reveals the complexity of GATA and ets factor involvement in Megakaryocytopoiesis and an unexpected potential role for GATA-6. *Experimental Hematology* **34**:654–663. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.01.014>, PMID: 16647571
- Eckly A, Strassel C, Cazenave JP, Lanza F, Léon C, Gachet C. 2012. Characterization of megakaryocyte development in the native bone marrow environment. *Methods in Molecular Biology* **788**:175–192. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-307-3_13, PMID: 22130708
- Ehrhardt C, Schmolke M, Matzke A, Knoblauch A, Will C, Wixler V, Ludwig S. 2006. Polyethylenimine, a cost-effective transfection reagent. *Signal Transduction* **6**:179–184. DOI: <https://doi.org/10.1002/sita.200500073>
- Emsley P, Cowtan K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* **60**:2126–2132. DOI: <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>, PMID: 15572765
- Evans PR, Murshudov GN. 2013. How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **69**:1204–1214. DOI: <https://doi.org/10.1107/S0907444913000061>, PMID: 23793146
- Farach-Carson MC, Warren CR, Harrington DA, Carson DD. 2014. Border patrol: insights into the unique role of perlecan/heparan sulfate proteoglycan 2 at cell and tissue borders. *Matrix Biology* **34**:64–79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.08.004>, PMID: 24001398
- Fitzgerald LA, Leung B, Phillips DR. 1985. A method for purifying the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Analytical Biochemistry* **151**:169–177. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90067-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90067-3), PMID: 3004257
- Fukuhara N, Howitt JA, Hussain SA, Hohenester E. 2008. Structural and functional analysis of slit and heparin binding to immunoglobulin-like domains 1 and 2 of *Drosophila robo*. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 16226–16234. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M800688200>, PMID: 18359766
- Gao C, Boylan B, Fang J, Wilcox DA, Newman DK, Newman PJ. 2011. Heparin promotes platelet responsiveness by potentiating α IIb β 3-mediated outside-in signaling. *Blood* **117**:4946–4952. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-307751>, PMID: 21368290
- Gaur RK. 2014. Amino acid frequency distribution among eukaryotic proteins. *The IIOAB Journal* **5**.
- Geer MJ, van Geffen JP, Gopalasingam P, Vögtle T, Smith CW, Heising S, Kuijpers MJE, Tullemans BME, Jarvis GE, Eble JA, Jeeves M, Overduin M, Heemskerk JWM, Mazharian A, Senis YA. 2018. Uncoupling ITIM receptor G6b-B from tyrosine phosphatases Shp1 and Shp2 disrupts murine platelet homeostasis. *Blood* **132**:1413–1425. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-10-802975>, PMID: 29891536
- Han DK, Jeong SY, Kim YH. 1989. Evaluation of blood compatibility of PEO grafted and heparin immobilized polyurethanes. *Journal of Biomedical Materials Research* **23**. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.820231309>
- Hofmann I, Geer MJ, Vögtle T, Crispin A, Campagna DR, Barr A, Calicchio ML, Heising S, van Geffen JP, Kuijpers MJE, Heemskerk JWM, Eble JA, Schmitz-Abe K, Obeng EA, Douglas M, Freson K, Pondarré C, Favier R, Jarvis GE, Markianos K, et al. 2018. Congenital macrothrombocytopenia with focal myelofibrosis due to mutations in human G6b-B is rescued in humanized mice. *Blood* **132**:1399–1412. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-08-802769>, PMID: 29898956
- Jackson SP. 2011. Arterial thrombosis—insidious, unpredictable and deadly. *Nature Medicine* **17**:1423–1436. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.2515>
- Jurrus E, Engel D, Star K, Monson K, Brandi J, Felberg LE, Brookes DH, Wilson L, Chen J, Liles K, Chun M, Li P, Gohara DW, Dolinsky T, Konecny R, Koes DR, Nielsen JE, Head-Gordon T, Geng W, Krasny R, et al. 2018. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Science* **27**:112–128. DOI: <https://doi.org/10.1002/pro.3280>, PMID: 28836357
- Kabsch W. 2010. XDS. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* **66**:125–132. DOI: <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>, PMID: 20124692
- Källberg M, Wang H, Wang S, Peng J, Wang Z, Lu H, Xu J. 2012. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols* **7**:1511–1522. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.085>, PMID: 22814390
- Karplus PA, Diederichs K. 2012. Linking crystallographic model and data quality. *Science* **336**:1030–1033. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1218231>, PMID: 22628654
- Kauhanen P, Kovanen PT, Lassila R. 2000. Coimmobilized native macromolecular heparin proteoglycans strongly inhibit Platelet-Collagen interactions in flowing blood. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **20**: 113–119. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.11.e113>
- Kawamoto T. 2003. Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants. *Archives of Histology and Cytology* **66**:123–143. DOI: <https://doi.org/10.1679/aohc.66.123>, PMID: 12846553

- Kim YH, Nijst P, Kiefer K, Tang WH. 2017. Endothelial glycocalyx as biomarker for cardiovascular diseases: mechanistic and clinical implications. *Current Heart Failure Reports* **14**:117–126. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11897-017-0320-5>, PMID: 28233259
- Klein G, Conzelmann S, Beck S, Timpl R, Müller CA. 1995. Perlecan in human bone marrow: a growth-factor-presenting, but anti-adhesive, extracellular matrix component for hematopoietic cells. *Matrix Biology* **14**:457–465. DOI: [https://doi.org/10.1016/0945-053X\(95\)90003-9](https://doi.org/10.1016/0945-053X(95)90003-9), PMID: 7795884
- Krissinel E, Henrick K. 2007. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of Molecular Biology* **372**:774–797. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.022>, PMID: 17681537
- Lassila R, Lindstedt K, Kovanen PT. 1997. Native macromolecular heparin proteoglycans exocytosed from stimulated rat serosal mast cells strongly inhibit platelet-collagen interactions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **17**:3578–3587. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.17.12.3578>, PMID: 9437208
- Lassila R, Jouppila A. 2014. Mast cell-derived heparin proteoglycans as a model for a local antithrombotic. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* **40**:837–844. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0034-1395157>, PMID: 25393636
- Li W, Xu H, Xiao T, Cong L, Love MI, Zhang F, Irizarry RA, Liu JS, Brown M, Liu XS. 2014. MAGeCK enables robust identification of essential genes from genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screens. *Genome Biology* **15**:554. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0554-4>, PMID: 25476604
- Lindhout T, Blezer R, Schoen P, Willems GM, Fouache B, Verhoeven M, Hendriks M, Cahalan L, Cahalan PT. 1995. Antithrombin activity of surface-bound heparin studied under flow conditions. *Journal of Biomedical Materials Research* **29**:1255–1266. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.820291013>, PMID: 8557728
- Lord MS, Yu W, Cheng B, Simmons A, Poole-Warren L, Whitelock JM. 2009. The modulation of platelet and endothelial cell adhesion to vascular graft materials by perlecan. *Biomaterials* **30**:4898–4906. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.05.063>, PMID: 19540587
- Margalit H, Fischer N, Ben-Sasson SA. 1993. Comparative analysis of structurally defined heparin binding sequences reveals a distinct spatial distribution of basic residues. *The Journal of Biological Chemistry* **268**:19228–19231. PMID: 8366075
- Marki A, Esko JD, Pries AR, Ley K. 2015. Role of the endothelial surface layer in neutrophil recruitment. *Journal of Leukocyte Biology* **98**:503–515. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.3MR0115-011R>, PMID: 25979432
- Mazharian A, Ghevaert C, Zhang L, Massberg S, Watson SP. 2011. Dasatinib enhances megakaryocyte differentiation but inhibits platelet formation. *Blood* **117**:5198–5206. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-326850>
- Mazharian A, Wang YJ, Mori J, Bem D, Finney B, Heising S, Gissen P, White JG, Berndt MC, Gardiner EE, Nieswandt B, Douglas MR, Campbell RD, Watson SP, Senis YA. 2012. Mice lacking the ITIM-containing receptor G6b-B exhibit macrothrombocytopenia and aberrant platelet function. *Science Signaling* **5**:ra78. DOI: <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002936>, PMID: 23112346
- Mazharian A, Mori J, Wang YJ, Heising S, Neel BG, Watson SP, Senis YA. 2013. Megakaryocyte-specific deletion of the protein-tyrosine phosphatases Shp1 and Shp2 causes abnormal megakaryocyte development, platelet production, and function. *Blood* **121**:4205–4220. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-449272>, PMID: 23509158
- McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. 2007. Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography* **40**:658–674. DOI: <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206>, PMID: 19461840
- Melhem M, Abu-Farha M, Antony D, Madhoun AA, Bacchelli C, Alkayal F, AlKhairi I, John S, Alomari M, Beales PL, Alsmadi O. 2016. Novel G6B gene variant causes familial autosomal recessive thrombocytopenia and Anemia. *European Journal of Haematology* **98**:218–227. DOI: <https://doi.org/10.1111/ejh.12819>
- Meneghetti MCZ, Hughes AJ, Rudd TR, Nader HB, Powell AK, Yates EA, Lima MA. 2015. Heparan sulfate and heparin interactions with proteins. *Journal of the Royal Society Interface* **12**:20150589. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0589>
- Mori J, Pearce AC, Spalton JC, Grygielska B, Eble JA, Tomlinson MG, Senis YA, Watson SP. 2008. G6b-B inhibits constitutive and agonist-induced signaling by glycoprotein VI and CLEC-2. *Journal of Biological Chemistry* **283**:35419–35427. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M806895200>, PMID: 18955485
- Murdoch AD, Liu B, Schwarting R, Tuan RS, Iozzo RV. 1994. Widespread expression of perlecan proteoglycan in basement membranes and extracellular matrices of human tissues as detected by a novel monoclonal antibody against domain III and by in situ hybridization. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **42**:239–249. DOI: <https://doi.org/10.1177/42.2.7507142>, PMID: 7507142
- Murphy KJ, Merry CL, Lyon M, Thompson JE, Roberts IS, Gallagher JT. 2004. A new model for the domain structure of heparan sulfate based on the novel specificity of K5 lyase. *Journal of Biological Chemistry* **279**:27239–27245. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M401774200>, PMID: 15047699
- Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **53**:240–255. DOI: <https://doi.org/10.1107/S0907444996012255>, PMID: 15299926
- Nagy Z, Smolenski A. 2018. Cyclic nucleotide-dependent inhibitory signaling interweaves with activating pathways to determine platelet responses. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis* **2**:558–571. DOI: <https://doi.org/10.1002/rth2.12122>, PMID: 30046761
- Newland SA, Macaulay IC, Floto AR, de Vet EC, Ouweland WH, Watkins NA, Lyons PA, Campbell DR. 2007. The novel inhibitory receptor G6B is expressed on the surface of platelets and attenuates platelet function in vitro. *Blood* **109**:4806–4809. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2006-09-047449>, PMID: 17311996

- Nieswandt B, Watson SP. 2003. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* **102**:449–461. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2002-12-3882>
- Nugent MA, Nugent HM, Iozzo RV, Sanchack K, Edelman ER. 2000. Perlecan is required to inhibit thrombosis after deep vascular injury and contributes to endothelial cell-mediated inhibition of intimal hyperplasia. *PNAS* **97**:6722–6727. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.97.12.6722>, PMID: 10841569
- Olsson P, Lagergren H, Larsson R, Rådegran K. 1977. Prevention of platelet adhesion and aggregation by a glutaraldehyde-stabilized heparin surface. *Thrombosis and Haemostasis* **37**:274–282. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0038-1649228>
- Pearce AC, Senis YA, Billadeau DD, Turner M, Watson SP, Vigorito E. 2004. Vav1 and vav3 have critical but redundant roles in mediating platelet activation by collagen. *Journal of Biological Chemistry* **279**:53955–53962. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M410355200>, PMID: 15456756
- Pellegrini L, Burke DF, von Delft F, Mulloy B, Blundell TL. 2000. Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. *Nature* **407**:1029–1034. DOI: <https://doi.org/10.1038/35039551>, PMID: 11069186
- Saba HI, Saba SR, Morelli GA. 1984. Effect of heparin on platelet aggregation. *American Journal of Hematology* **17**:295–306. DOI: <https://doi.org/10.1002/ajh.2830170310>
- Saku T, Furthmayr H. 1989. Characterization of the major heparan sulfate proteoglycan secreted by bovine aortic endothelial cells in culture. Homology to the large molecular weight molecule of basement membranes. *The Journal of Biological Chemistry* **264**:3514–3523. PMID: 2521637
- Salzman EW, Rosenberg RD, Smith MH, Lindon JN, Favreau L. 1980. Effect of heparin and heparin fractions on platelet aggregation. *Journal of Clinical Investigation* **65**:64–73. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI109661>, PMID: 6243142
- Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahim OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A, Linhardt RJ, Mohammadi M. 2000. Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Molecular Cell* **6**:743–750. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00073-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00073-3), PMID: 11030354
- Segev A, Nili N, Strauss BH. 2004. The role of perlecan in arterial injury and angiogenesis. *Cardiovascular Research* **63**:603–610. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.03.028>, PMID: 15306215
- Semeniak D, Kulawig R, Stegner D, Meyer I, Schwiebert S, Bösing H, Eckes B, Nieswandt B, Schulze H. 2016. Proplatelet formation is selectively inhibited by collagen type I through Syk-independent GPVI signaling. *Journal of Cell Science* **129**:3473–3484. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.187971>, PMID: 27505889
- Senis YA, Tomlinson MG, Garcia A, Dumon S, Heath VL, Herbert J, Cobbold SP, Spalton JC, Ayman S, Antrobus R, Zitzmann N, Bicknell R, Frampton J, Authi KS, Martin A, Wakelam MJ, Watson SP. 2007. A comprehensive proteomics and genomics analysis reveals novel transmembrane proteins in human platelets and mouse megakaryocytes including G6b-B, a novel immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif protein. *Molecular & Cellular Proteomics* **6**:548–564. DOI: <https://doi.org/10.1074/mcp.D600007-MCP200>, PMID: 17186946
- Senis YA, Mazharian A, Mori J. 2014. Src family kinases: at the forefront of platelet activation. *Blood* **124**:2013–2024. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-453134>
- Sharma S, Bartholdson SJ, Couch ACM, Yusa K, Wright GJ. 2018. Genome-scale identification of cellular pathways required for cell surface recognition. *Genome Research* **28**:1372–1382. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.231183.117>, PMID: 29914970
- Smith CW, Raslan Z, Parfitt L, Khan AO, Patel P, Senis YA, Mazharian A. 2018. TREM-like transcript 1: a more sensitive marker of platelet activation than P-selectin in humans and mice. *Blood Advances* **2**:2072–2078. DOI: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018017756>, PMID: 30120105
- Sobel M, Fish WR, Toma N, Luo S, Bird K, Mori K, Kusumoto S, Blystone SD, Suda Y. 2001. Heparin modulates integrin function in human platelets. *Journal of Vascular Surgery* **33**:587–2A. DOI: <https://doi.org/10.1067/mva.2001.112696>, PMID: 11241131
- Sommer C, Straehle C, Kothe U, Hamprecht FA. 2011. Ilastik: interactive learning and segmentation toolkit. 2011 8th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 230–233. DOI: <https://doi.org/10.1109/isbi.2011.5872394>
- Trueb B. 2011. Biology of FGFR1, the fifth fibroblast growth factor receptor. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68**:951–964. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0576-3>, PMID: 21080029
- Vonrhein C, Flensburg C, Keller P, Sharff A, Smart O, Paciorek W, Womack T, Bricogne G. 2011. Data processing and analysis with the autoPROC toolbox. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* **67**:293–302. DOI: <https://doi.org/10.1107/S0907444911007773>, PMID: 21460447
- Whitelock JM, Melrose J, Iozzo RV. 2008. Diverse cell signaling events modulated by perlecan. *Biochemistry* **47**:11174–11183. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi8013938>, PMID: 18826258
- Williams CJ, Headd JJ, Moriarty NW, Prisant MG, Videau LL, Deis LN, Verma V, Keedy DA, Hintze BJ, Chen VB, Jain S, Lewis SM, Arendall WB, Snoeyink J, Adams PD, Lovell SC, Richardson JS, Richardson DC. 2018. MolProbity: more and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Science* **27**:293–315. DOI: <https://doi.org/10.1002/pro.3330>, PMID: 29067766
- Xu D, Esko JD. 2014. Demystifying heparan sulfate-protein interactions. *Annual Review of Biochemistry* **83**:129–157. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035314>, PMID: 24606135

Références bibliographiques

1. Gachet C. Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2006;46(1):277–300.
2. Strassel C, Lanza F, Gachet C. Plaquettes sanguines de culture : état de l'art. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine.* 2020;204(9):971–980.
3. Boneu B, Cazenave J-P. Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose - 2ème édition. Reims: 1997.
4. Margraf A, Zarbock A. Platelets in Inflammation and Resolution. *J.I.* 2019;203(9):2357–2367.
5. Amgalan A, Othman M. Exploring possible mechanisms for COVID-19 induced thrombocytopenia: Unanswered questions. *J Thromb Haemost.* 2020;18(6):1514–1516.
6. Colling ME, Kanthi Y. COVID-19-associated coagulopathy: An exploration of mechanisms. *Vasc Med.* 2020;25(5):471–478.
7. Hottz ED, Azevedo-Quintanilha IG, Palhinha L, et al. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19. *Blood.* 2020;136(11):1330–1341.
8. Greinacher A, Thiele T, Warkentin TE, et al. Thrombotic Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 Vaccination. *n engl j med.* 2021;10.
9. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* 1993;7(1):52–62.
10. Gresele P, Falcinelli E, Sebastiano M, Momi S. Matrix Metalloproteinases and Platelet Function. *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* 2017;147:133–165.
11. McNicol A, Israels SJ, Bennett JS. Platelet Dense Granules: Structure, Function and Implications for Haemostasis. *Thrombosis Research.* 1999;18.
12. Saultier P, Vidal L, Canault M, et al. Macrothrombocytopenia and dense granule deficiency associated with FLI1 variants: ultrastructural and pathogenic features. *Haematologica.* 2017;102(6):1006–1016.
13. Dupuis A, Bordet J-C, Eckly A, Gachet C. Platelet δ -Storage Pool Disease: An Update. *JCM.* 2020;9(8):2508.
14. Strassel C, Eckly A, Léon C, et al. Intrinsic impaired proplatelet formation and microtubule coil assembly of megakaryocytes in a mouse model of Bernard-Soulier syndrome. *Haematologica.* 2009;94(6):800–810.
15. Leon C, Eckly A, Hechler B, et al. Megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation dramatically affects hemostasis while preserving platelet aggregation and secretion. *Blood.* 2007;110(9):3183–3191.
16. 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.
17. Aguilar A, Weber J, Boscher J, et al. Combined deficiency of RAB32 and RAB38 in the mouse mimics Hermansky-Pudlak syndrome and critically impairs thrombosis. *Blood Advances.* 2019;3(15):2368–2380.
18. Berndt MC, Shen Y, Doppeide SM, Gardiner EE, Andrews RK. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb Haemost.* 2001;86(1):178–188.
19. Lanza F, Gachet C, Tovo D, Mangin P. Signalisation via le complexe GPIb-VIX plaquettaire. *Hématologie.* 2008;14(4):1–12.
20. Gremmel T, Frelinger A, Michelson A. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost.* 2016;42(03):191–204.
21. Lanza F. Bernard-Soulier syndrome (Hemorrhagic thrombocytopenic dystrophy). *Orphanet J Rare Dis.* 2006;1(1):46.
22. Nurden AT, Caen JP. An Abnormal Platelet Glycoprotein Pattern in Three Cases of Glanzmann's Thrombasthenia. *Br J Haematol.* 1974;28(2):253–260.
23. Belluci S, Caen J. Les thrombopathies constitutionnelles. *médecine/sciences.* 1985;1(8):404–411.

24. Heyns A du P, Badenhorst PN, Wessels P, Pieters H, Lötter MG. Kinetics, in vivo redistribution and sites of sequestration of indium-111-labelled platelets in giant platelet syndromes. *Br J Haematol*. 1985;60(2):323–330.
25. Aster RH, Keene WR. Sites of platelet destruction in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 1969;16(1):61–73.
26. Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, et al. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell*. 2007;128(6):1173–1186.
27. Hoffmeister KM, Falet H. Platelet clearance by the hepatic Ashwell-Morrell receptor: mechanisms and biological significance. *Thromb Res*. 2016;141 Suppl 2:S68-72.
28. McArthur K, Chappaz S, Kile BT. Apoptosis in megakaryocytes and platelets: the life and death of a lineage. *Blood*. 2018;131(6):605–610.
29. Grozovsky R, Giannini S, Falet H, Hoffmeister KM. Regulating billions of blood platelets: glycans and beyond. *Blood*. 2015;126(16):1877–1884.
30. Sørensen AL, Rumjantseva V, Nayeb-Hashemi S, et al. Role of sialic acid for platelet life span: exposure of beta-galactose results in the rapid clearance of platelets from the circulation by asialoglycoprotein receptor-expressing liver macrophages and hepatocytes. *Blood*. 2009;114(8):1645–1654.
31. Grozovsky R, Begonja AJ, Liu K, et al. The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nat Med*. 2015;21(1):47–54.
32. Emmons RVB, Reid DM, Cohen R, et al. Human Thrombopoietin Levels Are High When Thrombocytopenia Is Due to Megakaryocyte Deficiency and Low When Due to Increased Platelet Destruction. *Blood*. 1996;87(10):4068–4070.
33. de Graaf CA, Kauppi M, Baldwin T, et al. Regulation of hematopoietic stem cells by their mature progeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(50):21689–21694.
34. Smock KJ, Perkins SL. Thrombocytopenia: an update. *Int. Jnl. Lab. Hem*. 2014;36(3):269–278.
35. Gresele P, Harrison P, Bury L, et al. Diagnosis of suspected inherited platelet function disorders: results of a worldwide survey. *J Thromb Haemost*. 2014;12(9):1562–1569.
36. Boutroux H, Tabone M-D, Lapillonne H, et al. Les thrombopénies constitutionnelles. De la clinique aux actualités génétiques. *Revue d'Oncologie Hématologie Pédiatrique*. 2013;1(2):89–97.
37. Léon C, Dupuis A, Gachet C, Lanza F. Apport des modèles murins dans les thrombopénies constitutionnelles. *Hématologie*. 2015;21(5):262–279.
38. Bader-Meunier B, Proulle V, Trichet C, et al. Misdiagnosis of chronic thrombocytopenia in childhood. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2003;25(7):548–552.
39. Balduini CL, Pecci A, Noris P. Inherited thrombocytopenias: the evolving spectrum. *Hamostaseologie*. 2012;32(4):259–270.
40. Howell WH. The life-history of the formed elements of the blood, especially the red blood corpuscles. *J. Morphol*. 1890;4(1):57–116.
41. Wright JH. The Origin and Nature of the Blood Plates. *The Boston Medical and Surgical Journal*. 1906;154(23):643–645.
42. Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nature Medicine*. 2004;10(1):64–71.
43. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic Stem Cells. *The American Journal of Pathology*. 2006;169(2):338–346.
44. Debili N, Coulombel L, Croisille L, et al. Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow. *Blood*. 1996;88(4):1284–1296.
45. Kaushansky K. Determinants of platelet number and regulation of thrombopoiesis. *Hematology*. 2009;2009(1):147–152.
46. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest*. 2005;115(12):3339–3347.

47. Hitchcock IS, Kaushansky K. Thrombopoietin from beginning to end. *British Journal of Haematology*. 2014;165(2):259–268.
48. Mancini E, Sanjuan-Pla A, Luciani L, et al. FOG-1 and GATA-1 act sequentially to specify definitive megakaryocytic and erythroid progenitors. *EMBO J*. 2012;31(2):351–365.
49. Huang H, Yu M, Akie TE, et al. Differentiation-dependent interactions between RUNX-1 and FLI-1 during megakaryocyte development. *Mol Cell Biol*. 2009;29(15):4103–4115.
50. Mazzi S, Lordier L, Debili N, Raslova H, Vainchenker W. Megakaryocyte and polyploidization. *Experimental Hematology*. 2018;57:1–13.
51. Tijssen MR, Ghevaert C. Transcription factors in late megakaryopoiesis and related platelet disorders. *J Thromb Haemost*. 2013;11(4):593–604.
52. Schulze H, Korpál M, Hurov J, et al. Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood*. 2006;107(10):3868–3875.
53. Shaklai M, Tavassoli M. Demarcation membrane system in rat megakaryocyte and the mechanism of platelet formation: a membrane reorganization process. *Journal of Ultrastructure Research*. 1978;62(3):270–285.
54. Ebbe S, Stohlman F. Megakaryocytopoiesis in the rat. *Blood*. 1965;26:20–35.
55. Eckly A, Strassel C, Cazenave J-P, et al. Characterization of Megakaryocyte Development in the Native Bone Marrow Environment. *Platelets and Megakaryocytes*. 2012;788:175–192.
56. Chang Y, Bluteau D, Debili N, Vainchenker W. From hematopoietic stem cells to platelets: Megakaryocytic differentiation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007;5:318–327.
57. Nurden AT, Nurden P. Congenital platelet disorders and understanding of platelet function. *Br J Haematol*. 2014;165(2):165–178.
58. Sharda A, Flaumenhaft R. The life cycle of platelet granules. *F1000Res*. 2018;7:236.
59. Cramer EM, Norol F, Guichard J, et al. Ultrastructure of Platelet Formation by Human Megakaryocytes Cultured With the Mpl Ligand. *Blood*. 1997;89(7):2336–2346.
60. Heijnen HF, Debili N, Vainchenker W, et al. Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules. *Blood*. 1998;91(7):2313–2325.
61. Mazzi S, Lordier L, Debili N, Raslova H, Vainchenker W. Megakaryocyte and polyploidization. *Experimental Hematology*. 2018;57:1–13.
62. Lordier L, Jalil A, Aurade F, et al. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood*. 2008;112(8):3164–3174.
63. Vitrat N, Cohen-Solal K, Pique C, et al. Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis. *Blood*. 1998;91(10):3711–3723.
64. Ravid K, Lu J, Zimmet JM, Jones MR. Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J Cell Physiol*. 2002;190(1):7–20.
65. Geddis AE, Fox NE, Tkachenko E, Kaushansky K. Endomitotic Megakaryocytes that Form a Bipolar Spindle Exhibit Cleavage Furrow Ingression Followed by Furrow Regression. *Cell Cycle*. 2007;6(4):455–460.
66. Basant A, Glotzer M. Spatiotemporal Regulation of RhoA during Cytokinesis. *Curr Biol*. 2018;28(9):R570–R580.
67. Gao Y, Smith E, Ker E, et al. Role of RhoA-specific guanine exchange factors in regulation of endomitosis in megakaryocytes. *Dev Cell*. 2012;22(3):573–584.
68. Kaufman RM, Airo R, Pollack S, Crosby WH. Circulating megakaryocytes and platelet release in the lung. *Blood*. 1965;26(6):720–731.
69. Yamada E. The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat (Basel)*. 1957;29(3):267–290.
70. Zucker-Franklin D, Stahl C, Hyde P. Megakaryocyte Ultrastructure.: Its Relationship to Normal and Pathologic Thrombocytopoiesis. *Ann NY Acad Sci*. 1987;509(1 Factor VIII/v):25–33.
71. Behnke O, Forer A. From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *European Journal of Haematology*. 1998;60(S61):3–23.
72. Begonja AJ, Pluthero FG, Suphamungmee W, et al. FlnA binding to PACSIN2 F-BAR domain regulates membrane tubulation in megakaryocytes and platelets. 2015;126(1):9.

73. Meyer SC, Zuerbig S, Cunningham CC, et al. Identification of the Region in Actin-binding Protein that Binds to the Cytoplasmic Domain of Glycoprotein Ib α . *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(5):2914–2919.
74. Eckly A, Heijnen H, Pertuy F, et al. Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood*. 2014;123(6):921–930.
75. Ghalloussi D, Dhenge A, Bergmeier W. New insights into cytoskeletal remodeling during platelet production. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2019;17:1430–1439.
76. Eckly A, Strassel C, Freund M, et al. Abnormal megakaryocyte morphology and proplatelet formation in mice with megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation. *Blood*. 2009;113(14):3182–3189.
77. Tablin F, Castro M, Leven RM. Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *Journal of Cell Science*. 1990;59–70.
78. Scandola C, Erhardt M, Rinckel J-Y, et al. Use of electron microscopy to study megakaryocytes. *Platelets*. 2020;1–10.
79. Humble JG, Jayne WHW, Pulvertaft RJV. Biological Interaction Between Lymphocytes and Other Cells. *Br J Haematol*. 1956;2(3):283–294.
80. Xia P, Wang S, Guo Z, Yao X. Emperipolesis, entosis and beyond: Dance with fate. *Cell Research*. 2008;18(7):705–707.
81. Centurione L, Baldassarre AD, Zingariello M, et al. Increased and pathologic emperipolesis of neutrophils within megakaryocytes associated with marrow fibrosis in GATA-1^{low} mice. *Blood*. 2004;104(12):3573–3580.
82. Gupta N, Jadhav K, Shah V. Emperipolesis, entosis and cell cannibalism: Demystifying the cloud. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2017;21(1):92.
83. Cunin P, Bouslama R, Machlus KR, et al. Megakaryocyte emperipolesis mediates membrane transfer from intracytoplasmic neutrophils to platelets. *eLife*. 2019;8(e44031):22.
84. Hamada T, Möhle R, Hesselgesser J, et al. Transendothelial Migration of Megakaryocytes in Response to Stromal Cell-derived Factor 1 (SDF-1) Enhances Platelet Formation. *The Journal of Experimental Medicine*. 1998;188(3):539–548.
85. Rivière C, Subra F, Cohen-Solal K, et al. Phenotypic and functional evidence for the expression of CXCR4 receptor during megakaryocytopoiesis. *Blood*. 1999;93(5):1511–1523.
86. Mohle R, Green D, Moore MAS, Nachman RL, Rafii S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(2):663–668.
87. Wang JF, Liu ZY, Groopman JE. The alpha-chemokine receptor CXCR4 is expressed on the megakaryocytic lineage from progenitor to platelets and modulates migration and adhesion. *Blood*. 1998;92(3):756–764.
88. Lane WJ, Dias S, Hattori K, et al. Stromal-derived factor 1-induced megakaryocyte migration and platelet production is dependent on matrix metalloproteinases. 2000;96(13):9.
89. Bluteau O, Langlois T, Rivera-Munoz P, et al. Developmental changes in human megakaryopoiesis. *J Thromb Haemost*. 2013;11(9):1730–1741.
90. Niswander LM, Fegan KH, Kingsley PD, McGrath KE, Palis J. SDF-1 dynamically mediates megakaryocyte niche occupancy and thrombopoiesis at steady state and following radiation injury. *Blood*. 2014;124(2):277–286.
91. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*. 1998;393(6685):595–599.
92. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 1996;382(6592):635–638.
93. Dhanjal TS, Pendaries C, Ross EA, et al. A novel role for PECAM-1 in megakaryocytokinesis and recovery of platelet counts in thrombocytopenic mice. *Blood*. 2007;109(10):4237–4244.
94. Mazharian A, Watson SP, Séverin S. Critical role for ERK1/2 in bone marrow and fetal liver-derived primary megakaryocyte differentiation, motility, and proplatelet formation. *Exp Hematol*. 2009;37(10):1238–1249.e5.

95. Mazharian A, Thomas SG, Dhanjal TS, Buckley CD, Watson SP. Critical role of Src-Syk-PLC γ 2 signaling in megakaryocyte migration and thrombopoiesis. *Blood*. 2010;116(5):793–800.
96. Stegner D, vanEeuwijk JMM, Angay O, et al. Thrombopoiesis is spatially regulated by the bone marrow vasculature. *Nature Communications*. 2017;8(1):.
97. Lichtman MA, Chamberlain JK, Simon W, Santillo PA. Parasinusoidal location of megakaryocytes in marrow: A determinant of platelet release. *Am. J. Hematol*. 1978;4(4):303–312.
98. Morgan EA, Schneider JG, Baroni TE, et al. Dissection of platelet and myeloid cell defects by conditional targeting of the β 3-integrin subunit. *The FASEB Journal*. 2010;24(4):1117–1127.
99. Tiedt R, Schomber T, Hao-Shen H, Skoda RC. Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo. *Blood*. 2007;109(4):1503–1506.
100. Habart D, Cheli Y, Nugent DJ, Ruggeri ZM, Kunicki TJ. Conditional Knockout of Integrin α 2 β 1 in Murine Megakaryocytes Leads to Reduced Mean Platelet Volume. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e55094.
101. Ross EA, Freeman S, Zhao Y, et al. A Novel Role for PECAM-1 (CD31) in Regulating Haematopoietic Progenitor Cell Compartmentalization between the Peripheral Blood and Bone Marrow. *PLoS ONE*. 2008;3(6):e2338.
102. Wu Y, Welte T, Michaud M, Madri JA. PECAM-1: a multifaceted regulator of megakaryocytopoiesis. *Blood*. 2007;110(3):851–859.
103. Zhang L, Orban M, Lorenz M, et al. A novel role of sphingosine 1-phosphate receptor S1pr1 in mouse thrombopoiesis. *The Journal of Experimental Medicine*. 2012;209(12):2165–2181.
104. Sabri S, Foudi A, Boukour S, et al. Deficiency in the Wiskott-Aldrich protein induces premature proplatelet formation and platelet production in the bone marrow compartment. *Blood*. 2006;108(1):134–140.
105. Niazi H, Zoghmani N, Couty L, et al. Murine platelet production is suppressed by S1P release in the hematopoietic niche, not facilitated by blood S1P sensing. *Blood Advances*. 2019;3(11):1702–1713.
106. Radley JM, Haller CJ. Fate of senescent megakaryocytes in the bone marrow. *Br. J. Haematol*. 1983;53(2):277–287.
107. Zauli G, Vitale M, Falcieri E, et al. In vitro senescence and apoptotic cell death of human megakaryocytes. *Blood*. 1997;90(6):2234–2243.
108. De Botton S, Sabri S, Daugas E, et al. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood*. 2002;100(4):1310–1317.
109. Wolf BB, Goldstein JC, Stennicke HR, et al. Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation. *Blood*. 1999;94(5):1683–1692.
110. Aaronson RP, Blobel G. Isolation of nuclear pore complexes in association with a lamina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(3):1007–1011.
111. Lammerding J, Fong LG, Ji JY, et al. Lamins A and C but Not Lamin B1 Regulate Nuclear Mechanics. *J. Biol. Chem*. 2006;281(35):25768–25780.
112. Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, et al. Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science*. 2013;341(6149):1240104.
113. Shin J-W, Spinler KR, Swift J, et al. Lamins regulate cell trafficking and lineage maturation of adult human hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(47):18892–18897.
114. Merideth MA, Gordon LB, Clauss S, et al. Phenotype and Course of Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome. *N Engl J Med*. 2008;358(6):592–604.
115. Wolf K, Te Lindert M, Krause M, et al. Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *J Cell Biol*. 2013;201(7):1069–1084.

116. Thiery JP, Bessis M. Genesis of blood platelets from the megakaryocytes in living cells. *C R Hebd Seances Acad Sci.* 1956;242(2):290–292.
117. Becker RP. The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *The American Journal of Pathology.* 1976;145(2):183–205.
118. Muto M. A scanning and transmission electron microscopic study on rat bone marrow sinuses and transmural migration of blood cells. *Arch Histol Jpn.* 1976;39(1):51–66.
119. Debili N, Louache F, Vainchenker W. Isolation and Culture of Megakaryocyte Precursors. *Platelets and Megakaryocytes.* 2004;272:293–308.
120. 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.
121. Italiano JE, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood Platelets Are Assembled Principally at the Ends of Proplatelet Processes Produced by Differentiated Megakaryocytes. *J Cell Biol.* 1999;147(6):1299–1312.
122. Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3348–3354.
123. Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig JH, Italiano JE. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood.* 2005;106(13):4066–4075.
124. Junt T, Schulze H, Chen Z, et al. Dynamic Visualization of Thrombopoiesis Within Bone Marrow. *Science.* 2007;317(5845):1767–1770.
125. Brown E, Carlin LM, Nerlov C, Lo Celso C, Poole AW. Multiple membrane extrusion sites drive megakaryocyte migration into bone marrow blood vessels. *Life Science Alliance.* 2018;1(2):e201800061.
126. Bender M, Thon JN, Ehrlicher AJ, et al. Microtubule sliding drives proplatelet elongation and is dependent on cytoplasmic dynein. *Blood.* 2015;125(5):860–868.
127. Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, et al. A lineage-restricted and divergent β -tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Current Biology.* 2001;11(8):579–86.
128. Bornert A, Boscher J, Pertuy F, et al. Cytoskeletal-based mechanisms differently regulate in vivo and in vitro proplatelet formation. *Haematologica.* 2020;
129. Ellis L, Pan Y, Smyth GK, et al. Histone Deacetylase Inhibitor Panobinostat Induces Clinical Responses with Associated Alterations in Gene Expression Profiles in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2008;14(14):4500–4510.
130. 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.
131. 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):1786.
132. Antkowiak A, Viaud J, Severin S, et al. Cdc42-dependent F-actin dynamics drive structuration of the demarcation membrane system in megakaryocytes. *J Thromb Haemost.* 2016;14(6):1268–1284.
133. Thon JN, Montalvo A, Patel-Hett S, et al. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *Journal of Cell Biology.* 2010;191(4):861–874.
134. Pertuy F, Eckly A, Weber J, et al. Myosin IIA is critical for organelle distribution and F-actin organization in megakaryocytes and platelets. *Blood.* 2014;123(8):1261–1269.
135. Eckly A, Rinckel J-Y, Laeuffer P, et al. Proplatelet formation deficit and megakaryocyte death contribute to thrombocytopenia in Myh9 knockout mice: MYH9-related thrombocytopenia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2010;8(10):2243–2251.

136. Chen Y, Boukour S, Milloud R, et al. The abnormal proplatelet formation in MYH9-related macrothrombocytopenia results from an increased actomyosin contractility and is rescued by myosin IIA inhibition. 2013;13.
137. Bender M, Eckly A, Hartwig JH, et al. ADF/n-cofilin-dependent actin turnover determines platelet formation and sizing. *Blood*. 2010;116(10):1767–1775.
138. Jurak Begonja A, Hoffmeister KM, Hartwig JH, Falet H. FlnA-null megakaryocytes prematurely release large and fragile platelets that circulate poorly. *Blood*. 2011;118(8):2285–2295.
139. Nurden P, Debili N, Coupry I, et al. Thrombocytopenia resulting from mutations in filamin A can be expressed as an isolated syndrome. *Blood*. 2011;118(22):5928–5937.
140. Schachtner H, Calaminus SDJ, Sinclair A, et al. Megakaryocytes assemble podosomes that degrade matrix and protrude through basement membrane. *Blood*. 2013;121(13):2542–2552.
141. Moulding DA, Record J, Malinova D, Thrasher AJ. Actin cytoskeletal defects in immunodeficiency. *Immunol Rev*. 2013;256(1):282–299.
142. Thomas SG, Calaminus SDJ, Machesky LM, Alberts AS, Watson SP. G-protein coupled and ITAM receptor regulation of the formin FHOD1 through Rho Kinase in platelets: Letters to the Editor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011;9(8):1648–1651.
143. Guéguen P, Rouault K, Chen J-M, et al. A Missense Mutation in the Alpha-Actinin 1 Gene (ACTN1) Is the Cause of Autosomal Dominant Macrothrombocytopenia in a Large French Family. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e74728.
144. Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, et al. ACTN1 Mutations Cause Congenital Macrothrombocytopenia. *The American Journal of Human Genetics*. 2013;92(3):431–438.
145. Bottega R, Marconi C, Faleschini M, et al. ACTN1-related thrombocytopenia: identification of novel families for phenotypic characterization. *Blood*. 2015;125(5):869–872.
146. Sui Z, Nowak RB, Sanada C, et al. Regulation of actin polymerization by tropomodulin-3 controls megakaryocyte actin organization and platelet biogenesis. *Blood*. 2015;126(4):520–530.
147. Pleines I, Eckly A, Elvers M, et al. Multiple alterations of platelet functions dominated by increased secretion in mice lacking Cdc42 in platelets. *Blood*. 2010;115(16):3364–3373.
148. Heib T, Hermanns HM, Manukjan G, et al. RhoA/Cdc42 signaling drives cytoplasmic maturation but not endomitosis in megakaryocytes. *Cell Reports*. 2021;35(6):109102.
149. Akbar H, Kim J, Funk K, et al. Genetic and pharmacologic evidence that Rac1 GTPase is involved in regulation of platelet secretion and aggregation. *J Thromb Haemost*. 2007;5(8):1747–1755.
150. Akbar H, Shang X, Perveen R, et al. Specific Pharmacologic Targeting of Rho GTPases Rac1, Cdc42 and RhoA Reveals Their Differential and Critical Roles In Regulation of Platelet Activation. *Blood*. 2010;116(21):2019–2019.
151. Pleines I, Dütting S, Cherpokova D, et al. Defective tubulin organization and proplatelet formation in murine megakaryocytes lacking Rac1 and Cdc42. *Blood*. 2013;122(18):3178–3187.
152. Pleines I, Hagedorn I, Gupta S, et al. Megakaryocyte-specific RhoA deficiency causes macrothrombocytopenia and defective platelet activation in hemostasis and thrombosis. *Blood*. 2012;119(4):1054–1063.
153. Suzuki A, Shin J-W, Wang Y, et al. RhoA Is Essential for Maintaining Normal Megakaryocyte Ploidy and Platelet Generation. *PLOS ONE*. 2013;8(7):9.
154. Potts KS, Farley A, Dawson CA, et al. Membrane budding is a major mechanism of in vivo platelet biogenesis. *Journal of Experimental Medicine*. 2020;217(9):e20191206.
155. Zucker-Franklin D. Megakaryocytes and platelets. *Atlas of Blood Cells: Function and Pathology*. 1988;2:.
156. Radley J, Haller C. The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood*. 1982;60(1):213–219.
157. Zucker-Franklin D, Petursson S. Thrombocytopoiesis--analysis by membrane tracer and freeze-fracture studies on fresh human and cultured mouse megakaryocytes. *Journal of Cell Biology*. 1984;99(2):390–402.

158. Nishimura S, Nagasaki M, Kunishima S, et al. IL-1 α induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs. *Journal of Cell Biology*. 2015;209(3):453–466.
159. Howell WH, Donahue DD. The production of blood platelets in the lungs. *J Exp Med*. 1937;65(2):177–203.
160. Lefrançois E, Ortiz-Muñoz G, Cadrillier A, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature*. 2017;544(7648):105–109.
161. Johnston I, Hayes V, Poncz M. Threading an elephant through the eye of a needle: Where are platelets made? *Cell Res*. 2017;27(9):1079–1080.
162. Pertuy F, Aguilar A, Strassel C, et al. Broader expression of the mouse platelet factor 4-cre transgene beyond the megakaryocyte lineage. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2014;13(1):115–125.
163. Kowata S, Isogai S, Murai K, et al. Platelet demand modulates the type of intravascular protrusion of megakaryocytes in bone marrow. *Thrombosis and Haemostasis*. 2014;112(10):743–756.
164. Leiva O, Leon C, Kah Ng S, et al. The role of extracellular matrix stiffness in megakaryocyte and platelet development and function. *Am J Hematol*. 2018;93(3):430–441.
165. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*. 2010;123(24):4195–4200.
166. Kirkpatrick CA, Selleck SB. Heparan sulfate proteoglycans at a glance. *Journal of Cell Science*. 2007;120(11):1829–1832.
167. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. 2009;326(5957):1216–1219.
168. Di Giacomo F, Lewandowski D, Cabannes E, et al. Heparan sulfate mimetics can efficiently mobilize long-term hematopoietic stem cells. *Haematologica*. 2012;97(4):491–499.
169. Vögtle T, Sharma S, Mori J, et al. Heparan sulfates are critical regulators of the inhibitory megakaryocyte-platelet receptor G6b-B. *eLife*. 2019;8(e46840):43.
170. Yurchenco PD. Basement Membranes: Cell Scaffoldings and Signaling Platforms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011;3(2):a004911–a004911.
171. Malara A, Abbonante V, Di Buduo CA, et al. The secret life of a megakaryocyte: emerging roles in bone marrow homeostasis control. *Cell. Mol. Life Sci*. 2015;72(8):1517–1536.
172. Schaff M, Tang C, Maurer E, et al. Integrin $\alpha 6 \beta 1$ Is the Main Receptor for Vascular Laminins and Plays a Role in Platelet Adhesion, Activation, and Arterial Thrombosis. *Circulation*. 2013;128(5):541–552.
173. Colognato H, Yurchenco PD. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn*. 2000;218(2):213–234.
174. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 20):3861–3863.
175. Zweegman S, Veenhof MA, Huijgens PC, Schuurhuis GJ, Dräger AM. Regulation of megakaryocytopoiesis in an in vitro stroma model: preferential adhesion of megakaryocytic progenitors and subsequent inhibition of maturation. *Exp Hematol*. 2000;28(4):401–410.
176. Malara A, Gruppi C, Celesti G, et al. Brief Report: Alternative Splicing of Extra Domain A (EIIIA) of Fibronectin Plays a Tissue-Specific Role in Hematopoietic Homeostasis. *Stem Cells*. 2016;34(8):2263–2268.
177. Maurer E, Schaff M, Receveur N, et al. Fibrillar cellular fibronectin supports efficient platelet aggregation and procoagulant activity. *Thromb Haemost*. 2015;114(12):1175–1188.
178. Régent M, Planus E, Bouin A-P, et al. Specificities of $\beta 1$ integrin signaling in the control of cell adhesion and adhesive strength. *European Journal of Cell Biology*. 2011;90(2–3):261–269.
179. Schick PK, Wojenski CM, He X, et al. Integrins Involved in the Adhesion of Megakaryocytes to Fibronectin and Fibrinogen. *Blood*. 1998;92(8):2650–2656.
180. Malara A, Gruppi C, Rebuzzini P, et al. Megakaryocyte-matrix interaction within bone marrow: new roles for fibronectin and factor XIII-A. *Blood*. 2011;117(8):2476–2483.

181. Pöschl E, Schlötzer-Schrehardt U, Brachvogel B, et al. Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development*. 2004;131(7):1619–1628.
182. Abbonante V, Di Buduo CA, Gruppi C, et al. A new path to platelet production through matrix sensing. *Haematologica*. 2017;102(7):1150–1160.
183. Fox NE, Kaushansky K. Engagement of integrin $\alpha\beta 1$ enhances thrombopoietin-induced megakaryopoiesis. *Experimental Hematology*. 2005;33(1):94–99.
184. Malara A, Gruppi C, Pallotta I, et al. Extracellular matrix structure and nano-mechanics determine megakaryocyte function. *Blood*. 2011;118(16):4449–4453.
185. Larson MK, Watson SP. Regulation of proplatelet formation and platelet release by integrin $\text{IIb}\beta 3$. *Blood*. 2006;108(5):1509–1514.
186. Blin A, Le Goff A, Magniez A, et al. Microfluidic model of the platelet-generating organ: beyond bone marrow biomimetics. *Sci Rep*. 2016;6(1):21700.
187. Davis GE, Senger DR. Endothelial Extracellular Matrix: Biosynthesis, Remodeling, and Functions During Vascular Morphogenesis and Neovessel Stabilization. *Circulation Research*. 2005;97(11):1093–1107.
188. Malara A, Currao M, Gruppi C, et al. Megakaryocytes Contribute to the Bone Marrow-Matrix Environment by Expressing Fibronectin, Type IV Collagen, and Laminin: Mks Express Basement Membrane Components. *STEM CELLS*. 2014;32(4):926–937.
189. Ignatz R. Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor- β action. *Cell*. 1987;51(2):189–197.
190. Hocevar BA, Brown TL, Howe PH. TGF- β induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J*. 1999;18(5):1345–1356.
191. Abbonante V, Di Buduo CA, Gruppi C, et al. Thrombopoietin/TGF- $\beta 1$ Loop Regulates Megakaryocyte Extracellular Matrix Component Synthesis: Mechanism of ECM Component Synthesis by Mks. *Stem Cells*. 2016;34(4):1123–1133.
192. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(3):221–233.
193. Li H, Daculsi R, Bareille R, Bourget C, Amedee J. uPA and MMP-2 were involved in self-assembled network formation in a two dimensional co-culture model of bone marrow stromal cells and endothelial cells. *J Cell Biochem*. 2013;114(3):650–657.
194. Høyer-Hansen G, Behrendt N, Ploug M, Danø K, Preissner KT. The intact urokinase receptor is required for efficient vitronectin binding: receptor cleavage prevents ligand interaction. *FEBS Lett*. 1997;420(1):79–85.
195. Smith HW, Marshall CJ. Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(1):23–36.
196. Lucero HA, Kagan HM. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(19–20):2304–2316.
197. Eliades A, Papadantonakis N, Bhupatiraju A, et al. Control of megakaryocyte expansion and bone marrow fibrosis by lysyl oxidase. *J Biol Chem*. 2011;286(31):27630–27638.
198. Michiels JJ, Moosdorff W, Maasland H, et al. Duplex ultrasound, clinical score, thrombotic risk, and D-dimer testing for evidence based diagnosis and management of deep vein thrombosis and alternative diagnoses in the primary care setting and outpatient ward. *Int Angiol*. 2014;33(1):1–19.
199. Levental KR, Yu H, Kass L, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 2009;139(5):891–906.
200. Ilkan Z, Wright JR, Goodall AH, et al. Evidence for shear-mediated Ca^{2+} entry through mechanosensitive cation channels in human platelets and a megakaryocytic cell line. *J Biol Chem*. 2017;292(22):9204–9217.
201. Caulier A, Jankovsky N, Demont Y, et al. PIEZO1 activation delays erythroid differentiation of normal and hereditary xerocytosis-derived human progenitor cells. *Haematologica*. 2020;105(3):610–622.

202. Aguilar A, Pertuy F, Eckly A, et al. Importance of environmental stiffness for megakaryocyte differentiation and proplatelet formation. *Blood*. 2016;128(16):2022–2032.
203. Inoue S, Osmond DG. Basement membrane of mouse bone marrow sinusoids shows distinctive structure and proteoglycan composition: A high resolution ultrastructural study. *Anat. Rec*. 2001;264(3):294–304.
204. Sekiguchi R, Yamada KM. Basement Membranes in Development and Disease. *Current Topics in Developmental Biology*. 2018;130:143–191.
205. Pozzi A, Yurchenco PD, Iozzo RV. The nature and biology of basement membranes. *Matrix Biology*. 2017;57–58:1–11.
206. Wang S, Voisin M-B, Larbi KY, et al. Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *The Journal of Experimental Medicine*. 2006;203(6):1519–1532.
207. Voisin M-B, Woodfin A, Nourshargh S. Monocytes and Neutrophils Exhibit Both Distinct and Common Mechanisms in Penetrating the Vascular Basement Membrane In Vivo. *ATVB*. 2009;29(8):1193–1199.
208. Kopp W. Pathogenesis and etiology of essential hypertension: role of dietary carbohydrate. *Med Hypotheses*. 2005;64(4):782–787.
209. Kopp H-G, Hooper AT, Avcilla ST, Rafii S. Functional heterogeneity of the bone marrow vascular niche. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1176:47–54.
210. Itkin T, Gur-Cohen S, Spencer JA, et al. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature*. 2016;532(7599):323–328.
211. Rademakers T, Goedhart M, Hoogenboezem M, et al. Hematopoietic stem and progenitor cells use podosomes to transcellularly cross the bone marrow endothelium. *Haematologica*. 2020;105(12):2746–2756.
212. Rafii S, Shapiro F, Pettengell R, et al. Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors. *Blood*. 1995;86(9):3353–3363.
213. Tavassoli M, Aoki M. Migration of Entire Megakaryocytes through the Marrow-Blood Barrier. *British Journal of Haematology*. 1981;48(1):25–29.
214. Carman CV, Sage PT, Sciuto TE, et al. Transcellular Diapedesis Is Initiated by Invasive Podosomes. *Immunity*. 2007;26(6):784–797.
215. Alon R, van Buul JD. Leukocyte Breaching of Endothelial Barriers: The Actin Link. *Trends in Immunology*. 2017;38(8):606–615.
216. Martinelli R, Zeiger AS, Whitfield M, et al. Probing the biomechanical contribution of the endothelium to lymphocyte migration: diapedesis by the path of least resistance. *Journal of Cell Science*. 2014;jcs.148619.
217. Wang X, Schwarz TL. The mechanism of Ca²⁺-dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. *Cell*. 2009;136(1):163–174.
218. Boyer L, Doye A, Rolando M, et al. Induction of transient macroapertures in endothelial cells through RhoA inhibition by Staphylococcus aureus factors. *Journal of Cell Biology*. 2006;173(5):809–819.
219. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(9):678–689.
220. Stapor PC, Sweat RS, Dashti DC, Betancourt AM, Murfee WL. Pericyte Dynamics during Angiogenesis: New Insights from New Identities. *J Vasc Res*. 2014;51(3):163–174.
221. Tamura S, Suzuki-Inoue K, Tsukiji N, et al. Podoplanin-positive periarteriolar stromal cells promote megakaryocyte growth and proplatelet formation in mice by CLEC-2. 2016;127(13):11.
222. Brouard N, Jost C, Matthias N, et al. A unique microenvironment in the developing liver supports the expansion of megakaryocyte progenitors. *Blood Adv*. 2017;1(21):1854–1866.
223. Berthiaume A-A, Grant RI, McDowell KP, et al. Dynamic Remodeling of Pericytes In Vivo Maintains Capillary Coverage in the Adult Mouse Brain. *Cell Reports*. 2018;22(1):8–16.

224. Feng D, Nagy JA, Pyne K, Dvorak HF, Dvorak AM. Neutrophils Emigrate from Venules by a Transendothelial Cell Pathway in Response to FMLP. *Journal of Experimental Medicine*. 1998;187(6):903–915.
225. Proebstl D, Voisin M-B, Woodfin A, et al. Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 2012;209(6):1219–1234.
226. Woodfin A, Voisin M-B, Nourshargh S. Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Curr Opin Hematol*. 2010;17(1):9–17.
227. Stratman AN, Malotte KM, Mahan RD, Davis MJ, Davis GE. Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood*. 2009;114(24):5091–5101.
228. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005;121(7):1109–1121.
229. Acar M, Kocherlakota KS, Murphy MM, et al. Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature*. 2015;526(7571):126–130.
230. Ding L, Morrison SJ. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature*. 2013;495(7440):231–235.
231. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12–CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006;25(6):977–988.
232. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829–834.
233. Tamkun JW, DeSimone DW, Fonda D, et al. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell*. 1986;46(2):271–282.
234. Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*. 1987;48(4):549–554.
235. Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer. New York, NY: Springer New York; 2010.
236. Campbell ID, Humphries MJ. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(3):a004994.
237. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res*. 2010;339(1):269–280.
238. Leiss M, Beckmann K, Girós A, Costell M, Fässler R. The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20(5):502–507.
239. Niu G, Chen X. Why integrin as a primary target for imaging and therapy. *Theranostics*. 2011;1:30–47.
240. Ye F, Hu G, Taylor D, et al. Recreation of the terminal events in physiological integrin activation. *Journal of Cell Biology*. 2010;188(1):157–173.
241. Payrastre B, Alessi M-C, Sie P. Pathophysiology of inherited platelet disorders. *Hématologie*. 2014;20(1):20–35.
242. Zaidel-Bar R, Itzkovitz S, Ma'ayan A, Iyengar R, Geiger B. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol*. 2007;9(8):858–867.
243. Geiger T, Zaidel-Bar R. Opening the floodgates: proteomics and the integrin adhesome. *Curr Opin Cell Biol*. 2012;24(5):562–568.
244. Legate KR, Fässler R. Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 2):187–198.
245. van der Flier A, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res*. 2001;305(3):285–298.
246. Mousni A, Sick E, Carl P, et al. Targeting Focal Adhesion Kinase Using Inhibitors of Protein-Protein Interactions. *Cancers*. 2018;10(9):278.
247. Deramaudt TB, Dujardin D, Hamadi A, et al. FAK phosphorylation at Tyr-925 regulates cross-talk between focal adhesion turnover and cell protrusion. *MBoC*. 2011;22(7):964–975.
248. Calderwood DA. Integrin activation. *Journal of Cell Science*. 2004;117(5):657–666.
249. Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(11):793–805.

250. Biggs MJ, Richards RG, Dalby MJ. Nanotopographical modification: a regulator of cellular function through focal adhesions. *Nanomedicine*. 2010;6(5):619–633.
251. Ballestrem C, Hinz B, Imhof BA, Wehrle-Haller B. Marching at the front and dragging behind. *Journal of Cell Biology*. 2001;155(7):1319–1332.
252. Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 1995;81(1):53–62.
253. Clark K, Pankov R, Travis MA, et al. A specific alpha5beta1-integrin conformation promotes directional integrin translocation and fibronectin matrix formation. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 2):291–300.
254. Zhang X, Jiang G, Cai Y, et al. Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nat Cell Biol*. 2008;10(9):1062–1068.
255. Huvener S, Danen EHJ. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *Journal of Cell Science*. 2009;122(8):1059–1069.
256. DeMali KA, Burridge K. Coupling membrane protrusion and cell adhesion. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 12):2389–2397.
257. Dubash AD, Menold MM, Samson T, et al. Chapter 1 Focal Adhesions: New Angles on an Old Structure. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2009;277:1–65.
258. Schiller HB, Hermann M-R, Polleux J, et al. β 1- and α v-class integrins cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments. *Nat Cell Biol*. 2013;15(6):625–636.
259. Mierke CT, Frey B, Fellner M, Herrmann M, Fabry B. Integrin α 5 β 1 facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 3):369–383.
260. Milloud R, Destaing O, de Mets R, et al. α v β 3 integrins negatively regulate cellular forces by phosphorylation of its distal NPXY site: α v β 3 integrins and cell forces regulation. *Biol. Cell*. 2017;109(3):127–137.
261. De Mets R, Wang I, Balland M, et al. Cellular tension encodes local Src-dependent differential β 1 and β 3 integrin mobility. *MBoC*. 2019;30(2):181–190.
262. Rossier O, Octeau V, Sibarita J-B, et al. Integrins β 1 and β 3 exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nat Cell Biol*. 2012;14(10):1057–1067.
263. Matsunaga T, Fukai F, Kameda T, et al. Potentiated activation of VLA-4 and VLA-5 accelerates proplatelet-like formation. *Ann Hematol*. 2012;91(10):1633–1643.
264. Friedl P, Bröcker EB, Zänker KS. Integrins, cell matrix interactions and cell migration strategies: fundamental differences in leukocytes and tumor cells. *Cell Adhes Commun*. 1998;6(2–3):225–236.
265. Friedl P, Zänker KS, Bröcker EB. Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc Res Tech*. 1998;43(5):369–378.
266. Yamada KM, Sixt M. Mechanisms of 3D cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(12):738–752.
267. Hecht I, Bar-El Y, Balmer F, et al. Tumor Invasion Optimization by Mesenchymal-Amoeboid Heterogeneity. *Sci Rep*. 2015;5(1):10622.
268. Blandin A-F, Noulet F, Renner G, et al. Glioma cell dispersion is driven by α 5 integrin-mediated cell–matrix and cell–cell interactions. *Cancer Letters*. 2016;376(2):328–338.
269. Mazharian A. Assessment of Megakaryocyte Migration and Chemotaxis. *Platelets and Megakaryocytes*. 2012;788:275–288.
270. Kowalska MA, Ratajczak J, Hoxie J, et al. Megakaryocyte precursors, megakaryocytes and platelets express the HIV co-receptor CXCR4 on their surface: determination of response to stromal-derived factor-1 by megakaryocytes and platelets. *Br J Haematol*. 1999;104(2):220–229.
271. Suraneni PK, Corey SJ, Hession M, et al. Dynamins 2 and 3 Are Required for Human Megakaryocytes Directional Migration. *Blood*. 2018;132(Supplement 1):2429–2429.
272. Mao Y, Schwarzbauer JE. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol*. 2005;24(6):389–399.

273. Zhong C, Chrzanowska-Wodnicka M, Brown J, et al. Rho-mediated Contractility Exposes a Cryptic Site in Fibronectin and Induces Fibronectin Matrix Assembly. *Journal of Cell Biology*. 1998;141(2):539–551.
274. Hsia HC, Nair MR, Corbett SA. The fate of internalized $\alpha 5$ integrin is regulated by matrix-capable fibronectin. *Journal of Surgical Research*. 2014;191(2):268–279.
275. Davidson PM, Sliz J, Isermann P, Denais C, Lammerding J. Design of a microfluidic device to quantify dynamic intra-nuclear deformation during cell migration through confining environments. *Integr. Biol*. 2015;7(12):1534–1546.
276. Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell*. 2011;147(5):992–1009.
277. Barzilay R, Ventorp F, Segal-Gavish H, et al. CD44 Deficiency Is Associated with Increased Susceptibility to Stress-Induced Anxiety-like Behavior in Mice. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2016;60(4):548–558.
278. Maniotis AJ, Chen CS, Ingber DE. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(3):849–854.
279. Belaadi N, Aureille J, Guilluy C. Under Pressure: Mechanical Stress Management in the Nucleus. *Cells*. 2016;5(2):27.
280. Wang N, Tytell JD, Ingber DE. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(1):75–82.
281. Troussard X, Vol S, Cornet E, et al. [Determination of full blood count normal reference values for adults in France]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2014;72(5):561–581.
282. Nurden AT. Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet J Rare Dis*. 2006;1(1):10.
283. Bury L, Malara A, Gresele P, Balduini A. Outside-In Signalling Generated by a Constitutively Activated Integrin $\alpha \text{IIb}\beta 3$ Impairs Proplatelet Formation in Human Megakaryocytes. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e34449.
284. Bury L, Falcinelli E, Chiasserini D, et al. Cytoskeletal perturbation leads to platelet dysfunction and thrombocytopenia in variant forms of Glanzmann thrombasthenia. *Haematologica*. 2016;101(1):46–56.
285. Favier M, Bordet J-C, Favier R, et al. Mutations of the integrin $\alpha \text{IIb}/\beta 3$ intracytoplasmic salt bridge cause macrothrombocytopenia and enlarged platelet α -granules. *Am J Hematol*. 2018;93(2):195–204.
286. Kashiwagi H, Kunishima S, Kiyomizu K, et al. Demonstration of novel gain-of-function mutations of $\alpha \text{IIb}\beta 3$: association with macrothrombocytopenia and glanzmann thrombasthenia-like phenotype. *Mol Genet Genomic Med*. 2013;1(2):77–86.
287. Petzold T, Ruppert R, Pandey D, et al. $\beta 1$ integrin2mediated signals are required for platelet granule secretion and hemostasis in mouse. 2013;122(15):9.
288. Balduini A, Pallotta I, Malara A, et al. Adhesive receptors, extracellular proteins and myosin IIA orchestrate proplatelet formation by human megakaryocytes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2008;6(11):1900–1907.
289. Donada A, Balayn N, Sliwa D, et al. Disrupted filamin A/ $\alpha \text{IIb}\beta 3$ interaction induces macrothrombocytopenia by increasing RhoA activity. *Blood*. 2019;133(16):1778–1788.
290. Giannini S, Lee-Sundlov MM, Rivadeneyra L, et al. $\beta 4\text{GALT}1$ controls $\beta 1$ integrin function to govern thrombopoiesis and hematopoietic stem cell homeostasis. *Nat Commun*. 2020;11(1):356.
291. Molina-Ortiz P, Polizzi S, Ramery E, et al. Rasa3 Controls Megakaryocyte Rap1 Activation, Integrin Signaling and Differentiation into Proplatelet. *PLoS Genet*. 2014;10(6):e1004420.
292. Matsuura S, Thompson CR, Ng SK, et al. Adhesion to fibronectin via $\alpha 5\beta 1$ integrin supports expansion of the megakaryocyte lineage in primary myelofibrosis. *Blood*. 2020;135(25):2286–2291.
293. Linder S, Aepfelbacher M. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends in Cell Biology*. 2003;13(7):376–385.

294. Gawden-Bone C, West MA, Morrison VL, et al. A crucial role for $\alpha 2$ integrins in podosome formation, dynamics and Toll-like-receptor-signaled disassembly in dendritic cells. *Journal of Cell Science*. 2014;127(19):4213–4224.
295. Schachtner H, Calaminus SDJ, Thomas SG, Machesky LM. Podosomes in adhesion, migration, mechanosensing and matrix remodeling. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2013;70(10):572–589.
296. Linder S, Nelson D, Weiss M, Aepfelbacher M. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(17):9648–9653.
297. Burns S, Thrasher AJ, Blundell MP, Machesky L, Jones GE. Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood*. 2001;98(4):1142–1149.
298. Destaing O, Saltel F, Géminard J-C, Jurdic P, Bard F. Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol Biol Cell*. 2003;14(2):407–416.
299. Génot E. Les podosomes endothéliaux. *médecine/sciences*. 2009;25(2):168–174.
300. Tatin F, Varon C, Génot E, Moreau V. A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 4):769–781.
301. Mueller SC, Chen WT. Cellular invasion into matrix beads: localization of beta 1 integrins and fibronectin to the invadopodia. *J Cell Sci*. 1991;99 (Pt 2):213–225.
302. Gawden-Bone C, Zhou Z, King E, et al. Dendritic cell podosomes are protrusive and invade the extracellular matrix using metalloproteinase MMP-14. *Journal of Cell Science*. 2010;123(9):1427–1437.
303. Di Martino J, Henriot E, Ezzoukhry Z, et al. The microenvironment controls invadosome plasticity. *Journal of Cell Science*. 2016;129(9):1759–1768.
304. Saltel F, Daubon T, Juin A, et al. Invadosomes: Intriguing structures with promise. *European Journal of Cell Biology*. 2011;90(2–3):100–107.
305. Destaing O, Block MR, Planus E, Albiges-Rizo C. Invadosome regulation by adhesion signaling. *Current Opinion in Cell Biology*. 2011;23(5):597–606.
306. Linder S, Wiesner C, Himmel M. Degrading Devices: Invadosomes in Proteolytic Cell Invasion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2011;27(1):185–211.
307. Lakkakorpi P, Tuukkanen J, Hentunen T, Järvelin K, Väänänen K. Organization of osteoclast microfilaments during the attachment to bone surface in vitro. *J Bone Miner Res*. 1989;4(6):817–825.
308. Van Goethem E, Guet R, Balor S, et al. Macrophage podosomes go 3D. *European Journal of Cell Biology*. 2011;90(2–3):224–236.
309. Wiesner C, Le-Cabec V, El Azzouzi K, Maridonneau-Parini I, Linder S. Podosomes in space: macrophage migration and matrix degradation in 2D and 3D settings. *Cell Adh Migr*. 2014;8(3):179–191.
310. Wiesner C, El Azzouzi K, Linder S. A specific subset of RabGTPases controls cell surface exposure of MT1-MMP, extracellular matrix degradation and three-dimensional invasion of macrophages. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 13):2820–2833.
311. Vérollet C, Charrière GM, Labrousse A, et al. Extracellular proteolysis in macrophage migration: Losing grip for a breakthrough. *Eur. J. Immunol*. 2011;41(10):2805–2813.
312. Jevnikar Z, Mirković B, Fonović UP, et al. Three-dimensional invasion of macrophages is mediated by cysteine cathepsins in protrusive podosomes: Molecular immunology. *Eur. J. Immunol*. 2012;42(12):3429–3441.
313. Kubow KE, Horwitz AR. Reducing background fluorescence reveals adhesions in 3D matrices. *Nat Cell Biol*. 2011;13(1):3–5.
314. Luxenburg C, Geblinger D, Klein E, et al. The Architecture of the Adhesive Apparatus of Cultured Osteoclasts: From Podosome Formation to Sealing Zone Assembly. *PLoS ONE*. 2007;2(1):e179.

315. van den Dries K, Linder S, Maridonneau-Parini I, Poincloux R. Probing the mechanical landscape – new insights into podosome architecture and mechanics. *J Cell Sci.* 2019;132(24):jcs236828.
316. Labernadie A, Bouissou A, Delobelle P, et al. Protrusion force microscopy reveals oscillatory force generation and mechanosensing activity of human macrophage podosomes. *Nat Commun.* 2014;5(1):5343.
317. van den Dries K, Meddens MBM, de Keijzer S, et al. Interplay between myosin IIA-mediated contractility and actin network integrity orchestrates podosome composition and oscillations. *Nat Commun.* 2013;4(1):1412.
318. Mersich AT, Miller MR, Chkourko H, Blystone SD. The formin FRL1 (FMNL1) is an essential component of macrophage podosomes. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2010;67(9):573–585.
319. Bhuwania R, Cornfine S, Fang Z, et al. Supravillin couples myosin-dependent contractility to podosomes and enables their turnover. *Journal of Cell Science.* 2012;125(9):2300–2314.
320. Schoumacher M, Goldman RD, Louvard D, Vignjevic DM. Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. *The Journal of Cell Biology.* 2010;189(3):.
321. Jurdic P, Saltel F, Chabadel A, Destaing O. Podosome and sealing zone: Specificity of the osteoclast model. *European Journal of Cell Biology.* 2006;85(3–4):195–202.
322. Evans JG, Correia I, Krasavina O, Watson N, Matsudaira P. Macrophage podosomes assemble at the leading lamella by growth and fragmentation. *J Cell Biol.* 2003;161(4):697–705.
323. Feng X, Novack DV, Faccio R, et al. A Glanzmann's mutation in $\beta 3$ integrin specifically impairs osteoclast function. *J. Clin. Invest.* 2001;107(9):1137–1144.
324. Lakkakorpi PT, Nakamura I, Young M, et al. Abnormal localisation and hyperclustering of $(\alpha)(V)(\beta)(3)$ integrins and associated proteins in Src-deficient or tyrphostin A9-treated osteoclasts. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 1):149–160.
325. Chellaiah MA. Regulation of podosomes by integrin $\alpha v \beta 3$ and Rho GTPase-facilitated phosphoinositide signaling. *Eur J Cell Biol.* 2006;85(3–4):311–317.
326. Spuul P, Ciufici P, Veillat V, et al. Importance of RhoGTPases in formation, characteristics, and functions of invadosomes. *Small GTPases.* 2014;5(2):e28195.
327. Albiges-Rizo C, Destaing O, Fourcade B, Planus E, Block MR. Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *Journal of Cell Science.* 2009;122(17):3037–3049.
328. Zhang S, Han J, Sells MA, et al. Rho Family GTPases Regulate p38 Mitogen-activated Protein Kinase through the Downstream Mediator Pak1. *Journal of Biological Chemistry.* 1995;270(41):23934–23936.
329. Destaing O, Saltel F, Gilquin B, et al. A novel Rho-mDia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclasts. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 13):2901–2911.
330. Chellaiah MA, Soga N, Swanson S, et al. Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility, and bone resorption. *J Biol Chem.* 2000;275(16):11993–12002.
331. Vellino S, Oddou C, Rivier P, et al. Cross-talk between the calcium channel TRPV4 and reactive oxygen species interlocks adhesive and degradative functions of invadosomes. *Journal of Cell Biology.* 2021;220(2):e201910079.
332. van den Dries K, van Helden SFG, Riet J te, et al. Geometry sensing by dendritic cells dictates spatial organization and PGE2-induced dissolution of podosomes. *Cell. Mol. Life Sci.* 2012;69(11):1889–1901.
333. Collin O, Tracqui P, Stephanou A, et al. Spatiotemporal dynamics of actin-rich adhesion microdomains: influence of substrate flexibility. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 9):1914–1925.
334. Juin A, Planus E, Guillemot F, et al. Extracellular matrix rigidity controls podosome induction in microvascular endothelial cells. *Biology of the Cell.* 2013;105(1):46–57.
335. Duong LT, Lakkakorpi P, Nakamura I, Rodan GA. Integrins and signaling in osteoclast function. *Matrix Biology.* 2000;19(2):97–105.

336. Helfrich MH, Nesbitt SA, Lakkakorpi PT, et al. β 1 integrins and osteoclast function: Involvement in collagen recognition and bone resorption. *Bone*. 1996;19(4):317–328.
337. Schmidt S, Nakchbandi I, Ruppert R, et al. Kindlin-3–mediated signaling from multiple integrin classes is required for osteoclast-mediated bone resorption. *Journal of Cell Biology*. 2011;192(5):883–897.
338. Nakamura I, Pilkington MF, Lakkakorpi PT, et al. Role of α β 3 integrin in osteoclast migration and formation of the sealing zone. *Journal of Cell Science*. 1999;112:3985–3993.
339. Blair HC, Yaroslavskiy BB, Robinson LJ, et al. Osteopetrosis with micro-lacunar resorption because of defective integrin organization. *Lab Invest*. 2009;89(9):1007–1017.
340. Destaing O, Planus E, Bouvard D, et al. beta1A Integrin Is a Master Regulator of Invadosome Organization and Function. *Molecular Biology of the Cell*. 2010;21(23):4108–4119.
341. Gálvez BG, Matías-Román S, Yáñez-Mó M, Sánchez-Madrid F, Arroyo AG. ECM regulates MT1-MMP localization with β 1 or α β 3 integrins at distinct cell compartments modulating its internalization and activity on human endothelial cells. *Journal of Cell Biology*. 2002;159(3):509–521.
342. Destaing O, Petropoulos C, Albiges-Rizo C. Coupling between acto-adhesive machinery and ECM degradation in invadosomes. *Cell Adhesion & Migration*. 2014;8(3):256–262.
343. Kopp P, Lammers R, Aepfelbacher M, et al. The kinesin KIF1C and microtubule plus ends regulate podosome dynamics in macrophages. *Mol Biol Cell*. 2006;17(6):2811–2823.
344. Buschman MD, Bromann PA, Cejudo-Martin P, et al. The Novel Adaptor Protein Tks4 (SH3PXD2B) Is Required for Functional Podosome Formation. *MBoC*. 2009;20(5):1302–1311.
345. D’Souza-Schorey C, Chavrier P. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(5):347–358.
346. Jackson BC, Nebert DW, Vasiliou V. Update of human and mouse matrix metalloproteinase families. *Hum Genomics*. 2010;4(3):194.
347. Okada Y. Proteinases and Matrix Degradation. *Kelley and Firestein’s Textbook of Rheumatology*. 2017;106–125.
348. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(14):5578–5582.
349. Zhao P, Xu Y, Wei Y, et al. The CD44s splice isoform is a central mediator for invadopodia activity. *Journal of Cell Science*. 2016;129(7):1355–1365.
350. Feinberg TY, Zheng H, Liu R, et al. Divergent Matrix-Remodeling Strategies Distinguish Developmental from Neoplastic Mammary Epithelial Cell Invasion Programs. *Developmental Cell*. 2018;47(2):145-160.e6.
351. Lodillinsky C, Infante E, Guichard A, et al. p63/MT1-MMP axis is required for in situ to invasive transition in basal-like breast cancer. *Oncogene*. 2016;35(3):344–357.
352. Vos MC, Hollemans E, Ezendam N, et al. MMP-14 and CD44 in Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) in ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2016;9(1):53.
353. Castro-Castro A, Marchesin V, Monteiro P, et al. Cellular and Molecular Mechanisms of MT1-MMP-Dependent Cancer Cell Invasion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2016;32(1):555–576.
354. Ferrari R, Martin G, Tagit O, et al. MT1-MMP directs force-producing proteolytic contacts that drive tumor cell invasion. *Nat Commun*. 2019;10(1):4886.
355. Poincloux R, Lizárraga F, Chavrier P. Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *Journal of Cell Science*. 2009;122(17):3015–3024.
356. Bouissou A, Proag A, Bourg N, et al. Podosome Force Generation Machinery: A Local Balance between Protrusion at the Core and Traction at the Ring. *ACS Nano*. 2017;11(4):4028–4040.
357. Tamzalit F, Wang MS, Jin W, et al. Interfacial actin protrusions mechanically enhance killing by cytotoxic T cells. *Science Immunology*. 2019;4(33):eaav5445.
358. Kelley LC, Chi Q, Cáceres R, et al. Adaptive F-Actin Polymerization and Localized ATP Production Drive Basement Membrane Invasion in the Absence of MMPs. *Developmental Cell*. 2019;48(3):313-328.e8.

359. Snapper SB, Rosen FS. The Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP): Roles in Signaling and Cytoskeletal Organization. *Annu. Rev. Immunol.* 1999;17(1):905–929.
360. Poulter NS, Pollitt AY, Davies A, et al. Platelet actin nodules are podosome-like structures dependent on Wiskott–Aldrich syndrome protein and ARP2/3 complex. *Nature Communications.* 2015;6(1):.
361. Calaminus SDJ, Thomas S, McCARTY OJT, Machesky LM, Watson SP. Identification of a novel, actin-rich structure, the actin nodule, in the early stages of platelet spreading. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2008;6(11):1944–1952.
362. Cecchetti L, Tolley ND, Michetti N, et al. Megakaryocytes differentially sort mRNAs for matrix metalloproteinases and their inhibitors into platelets: a mechanism for regulating synthetic events. *Blood.* 2011;118(7):1903–1911.
363. Malara A, Ligi D, Di Buduo C, Mannello F, Balduini A. Sub-Cellular Localization of Metalloproteinases in Megakaryocytes. *Cells.* 2018;7(7):80.
364. Mallo L, Do Sacramento V, Gachet C, et al. Transcriptome analysis of the effect of AHR on productive and unproductive pathways of in vitro megakaryocytopoiesis. *Cell Biology;* 2021.
365. Villeneuve J, Block A, Le Bousse-Kerdilès M-C, et al. Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in platelets and megakaryocytes: A novel organization for these secreted proteins. *Experimental Hematology.* 2009;37(7):849–856.
366. Paul DS, Casari C, Wu C, et al. Deletion of the Arp2/3 complex in megakaryocytes leads to microthrombocytopenia in mice. *Blood Adv.* 2017;1(18):1398–1408.
367. Spindler M, van Eeuwijk JMM, Schurr Y, et al. ADAP deficiency impairs megakaryocyte polarization with ectopic proplatelet release and causes microthrombocytopenia. *Blood.* 2018;132(6):635–646.
368. Bhatlekar S, Manne BK, Basak I, et al. miR-125a-5p regulates megakaryocyte proplatelet formation via the actin-bundling protein L-plastin. *Blood.* 2020;136(15):1760–1772.
369. Geue S, Aurbach K, Manke M-C, et al. Pivotal role of PDK1 in megakaryocyte cytoskeletal dynamics and polarization during platelet biogenesis. *Blood.* 2019;134(21):1847–1858.
370. Borensztein P, Cramer É, Coulombel L, et al. Traitement du déficit immunitaire combiné sévère lié à l’X par transfert ex vivo du gène gc. *médecine/sciences.* 2000;16:4.
371. Thrasher AJ, Burns SO. WASP: a key immunological multitasker. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(3):182–192.
372. Rivers E, Worth A, Thrasher AJ, Burns SO. How I manage patients with Wiskott Aldrich syndrome. *Br J Haematol.* 2019;185(4):647–655.
373. Burns S, Cory GO, Vainchenker W, Thrasher AJ. Mechanisms of WASp-mediated hematologic and immunologic disease. *Blood.* 2004;104(12):3454–3462.
374. Gabelli M, Marzollo A, Notarangelo LD, Basso G, Putti MC. Eltrombopag use in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome. *Pediatr Blood Cancer.* 2017;64(12):.
375. Somech R, Lev A, Lee YN, et al. Disruption of Thrombocyte and T Lymphocyte Development by a Mutation in ARPC1B. *J Immunol.* 2017;199(12):4036–4045.
376. Kahr WHA, Pluthero FG, Elkadri A, et al. Loss of the Arp2/3 complex component ARPC1B causes platelet abnormalities and predisposes to inflammatory disease. *Nature Communications.* 2017;8:14816.
377. Brigida I, Zoccolillo M, Cicalese MP, et al. T-cell defects in patients with ARPC1B germline mutations account for combined immunodeficiency. *Blood.* 2018;132(22):2362–2374.
378. Papalazarou V, Machesky LM. The cell pushes back: The Arp2/3 complex is a key orchestrator of cellular responses to environmental forces. *Current Opinion in Cell Biology.* 2021;68:37–44.
379. Maurin J, Blangy A, Bompard G. Regulation of invadosomes by microtubules: Not only a matter of railways. *European Journal of Cell Biology.* 2020;99(7):151109.
380. Meddens MBM, Pandzic E, Slotman JA, et al. Actomyosin-dependent dynamic spatial patterns of cytoskeletal components drive mesoscale podosome organization. *Nat Commun.* 2016;7(1):13127.

381. Rafiq NBM, Greci G, Lim CK, et al. Forces and constraints controlling podosome assembly and disassembly. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2019;374(1779):20180228.
382. Groom AC, MacDonald IC, Schmidt EE. Splenic Microcirculatory Blood Flow and Function with Respect to Red Blood Cells. *The Complete Spleen.* 2002;23–50.
383. Dütting S, Gaits-Iacovoni F, Stegner D, et al. A Cdc42/RhoA regulatory circuit downstream of glycoprotein Ib guides transendothelial platelet biogenesis. *Nature Communications.* 2017;8:15838.
384. Keenan TM, Folch A. Biomolecular gradients in cell culture systems. *Lab Chip.* 2008;8(1):34–57.
385. Zhang X, Cook PC, Zindy E, et al. Integrin $\alpha 4\beta 1$ controls G9a activity that regulates epigenetic changes and nuclear properties required for lymphocyte migration. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(7):3031–3044.
386. Tusamda Wakhloo N, Anders S, Badique F, et al. Actomyosin, vimentin and LINC complex pull on osteosarcoma nuclei to deform on micropillar topography. *Biomaterials.* 2020;234:119746.
387. Artym VV, Zhang Y, Seillier-Moisewitsch F, Yamada KM, Mueller SC. Dynamic Interactions of Cortactin and Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase at Invadopodia: Defining the Stages of Invadopodia Formation and Function. *Cancer Research.* 2006;66(6):3034–3043.
388. Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, et al. MT1-MMP-Deficient Mice Develop Dwarfism, Osteopenia, Arthritis, and Connective Tissue Disease due to Inadequate Collagen Turnover. *Cell.* 1999;99(1):81–92.
389. Zhou Z, Apte SS, Soyninen R, et al. Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2000;97(8):4052–4057.
390. Sakamoto T, Seiki M. Cytoplasmic tail of MT1-MMP regulates macrophage motility independently from its protease activity. *Genes to Cells.* 2009;14(5):617–626.
391. Nishida C, Kusubata K, Tashiro Y, et al. MT1-MMP plays a critical role in hematopoiesis by regulating HIF-mediated chemokine/cytokine gene transcription within niche cells. *Blood.* 2012;119(23):5405–5416.
392. Tang Y, Rowe RG, Botvinick EL, et al. MT1-MMP-Dependent Control of Skeletal Stem Cell Commitment via a $\beta 1$ -Integrin/YAP/TAZ Signaling Axis. *Developmental Cell.* 2013;25(4):402–416.
393. Tokuyasu KT. A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *The Journal of Cell Biology.* 1973;57(2):551–565.
394. Wang J, Tsirka SE. Neuroprotection by inhibition of matrix metalloproteinases in a mouse model of intracerebral haemorrhage. *Brain.* 2005;128(7):1622–1633.
395. Gill SE, Pape MC, Leco KJ. Tissue inhibitor of metalloproteinases 3 regulates extracellular matrix—Cell signaling during bronchiole branching morphogenesis. *Developmental Biology.* 2006;298(2):540–554.
396. Feng S, Cen J, Huang Y, et al. Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Secreted by Leukemic Cells Increase the Permeability of Blood-Brain Barrier by Disrupting Tight Junction Proteins. *PLoS ONE.* 2011;6(8):e20599.
397. Bellayr I, Holden K, Mu X, Pan H, Li Y. Matrix metalloproteinase inhibition negatively affects muscle stem cell behavior. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(2):124–141.
398. Dupont-Deshorgue A, Oudart JB, Brassart B, et al. A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of tetrastatin in body fluids and tumor extracts. *Analytical Biochemistry.* 2015;482:16–21.
399. Sheu JR, Fong TH, Liu CM, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 in human platelets: regulation of platelet activation in *in vitro* and *in vivo* studies: Activated MMP-9 inhibits platelet aggregation. *British Journal of Pharmacology.* 2004;143(1):193–201.
400. De Groef L, Andries L, Lemmens K, Van Hove I, Moons L. Matrix metalloproteinases in the mouse retina: a comparative study of expression patterns and MMP antibodies. *BMC Ophthalmol.* 2015;15(1):187.

401. Xie SQ, Lavitas L-M, Pombo A. CryoFISH: Fluorescence In Situ Hybridization on Ultrathin Cryosections. *Fluorescence in situ Hybridization (FISH)*. 2010;659:219–230.
402. Petrey AC, Obery DR, Kessler SP, Flamion B, de la Motte CA. Hyaluronan Depolymerization by Megakaryocyte Hyaluronidase-2 Is Required for Thrombopoiesis. *The American Journal of Pathology*. 2016;186(9):2390–2403.
403. Senis YA, Mazharian A, Mori J. Src family kinases: at the forefront of platelet activation. *Blood*. 2014;124(13):2013–2024.
404. Greenberg S, Rosenthal D, Greeley T, Tantravahi R, Handin R. Characterization of a new megakaryocytic cell line: the Dami cell. *Blood*. 1988;72(6):1968–1977.

Formation of blood platelets: mechanisms involved in megakaryocytes intravasation across medullar sinusoids.

Blood platelets are vital for the prevention of bleeding. A key and still poorly understood step in their formation is the passage of their precursors, megakaryocytes (MKs), through the endothelial barrier of the medullary sinusoids, to release cytoplasmic fragments into the blood, which will remodel into platelets. The aim of the present thesis is to understand the cellular and molecular mechanisms involved in the intravasation of MKs.

In the first part, I characterized the invasive protrusions emitted *in situ* by MKs at the sinusoidal contact. These protrusions can invaginate deep into the endothelium until they cross it, leading MKs to take a transcellular route to the circulation. These structures, connected by a lateral actomyosin network, adopt a collective, interconnected organization, allowing MKs to perforate the endothelium at multiple points. The essential role of the actomyosin cytoskeleton in the *in vivo* organization of podosomes has been confirmed by analyzing the impact of Arp2/3 complex or myosin IIA deficiency in the megakaryocytic lineage. In the second part of the thesis, we focused on the role of integrins in MKs intravasation by using $\beta 1$ and $\beta 3$ integrin deficient mice, demonstrating that they prevent the passage of whole MKs through the sinusoids. Integrins control MKs intravasation by mediating their anchoring in the extracellular matrix and by modulating the physical and structural properties of their nuclei. Finally, in the third part of the thesis, we evaluated the contribution of metalloproteinases in the process of MKs intravasation. By investigating the bone marrow of MT1-MMP deficient mice, we demonstrated that this enzyme was not required for podosome formation and basement membrane passage. More generally, our data reveal that mature MKs from marrow do not have matrix degradation activity and that MMP activity is not required for platelet formation *in vivo*.

Our work has improved our understanding of a key step in thrombopoiesis, the transmigration of MKs through the sinusoids of the bone marrow. Many cell types elaborate these structures, including invasive cancer cells, macrophages and osteoclasts. This work therefore offers wider perspectives in cell biology. It provides insights into the mechanisms of intravasation of other blood cells as well as in a more pathological context of tumor cells.

Keywords: Megakaryocytes, bone marrow, platelets production, podosomes, integrins, metalloproteases

Formation des plaquettes sanguines : étude des mécanismes d'intravasation des mégacaryocytes au travers des sinusoides médullaires.

Les plaquettes sanguines sont vitales pour la prévention des hémorragies. Une étape clé et encore mal comprise dans leur formation est le passage de leurs précurseurs, les mégacaryocytes (MK) au travers de la barrière endothéliale des sinusoides médullaires, permettant de libérer des fragments cytoplasmiques dans le sang, lesquels se remodeleront ensuite en plaquettes dans la circulation. L'objectif de cette thèse a été de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'intravasation des MKs.

Dans la première partie, j'ai montré que les protrusions émises *in situ* par les MKs au contact des sinusoides sont des podosomes. Les podosomes s'invaginent profondément dans l'endothélium jusqu'à le traverser, permettant aux MKs d'emprunter une voie transcellulaire vers la circulation. Ils sont reliés par un réseau secondaire d'actomyosine, adoptant ainsi une organisation collective, interconnectée, permettant aux MKs de perforer l'endothélium en de multiples points. Le rôle essentiel du cytosquelette d'actomyosine dans la structuration des podosomes *in vivo*, a pu être confirmé en analysant l'impact des déficits en complexe Arp2/3 ou en myosine IIA dans la lignée mégacaryocytaire. Dans la deuxième partie de la thèse, nous nous sommes intéressés au rôle des intégrines dans l'intravasation des MKs par l'utilisation de souris déficientes en intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$. L'observation de la moelle de ces souris a mis en lumière le rôle essentiel des intégrines dans la prévention du passage de MKs entiers au travers des sinusoides. Les intégrines contrôlent l'intravasation des MKs en permettant leur ancrage dans la matrice extracellulaire et en modulant les propriétés physiques et structurales de leurs noyaux. Enfin, dans la troisième partie de la thèse, nous avons évalué la contribution des métalloprotéases dans ce processus. L'étude de la moelle osseuse de souris déficientes en MT1-MMP, nous a permis de démontrer que cette enzyme n'était pas nécessaire dans la formation des podosomes et au passage de la lame basale. Plus globalement, nos données révèlent que les MKs matures issus de la moelle n'ont pas d'activité de dégradation de la matrice et que l'activité des MMPs n'est pas nécessaire dans la formation des plaquettes *in vivo*.

L'ensemble de nos résultats permet une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'intravasation des MKs en identifiant l'un de ses principaux acteurs : le podosome. De nombreux types cellulaires forment ces structures d'adhésion particulières. Ce travail ouvre ainsi des perspectives plus larges en Biologie Cellulaire. Il amène des pistes pour explorer les mécanismes d'intravasation des autres cellules sanguines en générale ou dans un contexte plus pathologique de cellules tumorales.

Mots clés : Mégacaryocytes, moelle osseuse, production plaquettaire, podosome, intégrines, métalloprotéases