

Rôle de la chaperonne HSP 70 dans l'éythropoïèse inefficace des béta-thalassémies majeures

Jean-Benoît Arlet

► To cite this version:

Jean-Benoît Arlet. Rôle de la chaperonne HSP 70 dans l'éythropoïèse inefficace des béta-thalassémies majeures. Hématologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT: 2013PA11T040. tel-01078878

HAL Id: tel-01078878 https://theses.hal.science/tel-01078878

Submitted on 30 Oct 2014

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 PARIS XI FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS SUD Laboratoire CNRS UMR 8147 Hôpital Necker-Enfants Malades Paris

Année universitaire 2012 - 2013

N° attribué par la bibliothèque

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI École doctorale de Cancérologie

Présentée et soutenue publiquement par

Jean-Benoît ARLET

Né le 24 octobre 1975 à Toulouse (31)

Le 1^{er} juillet 2013

RÔLE DE LA CHAPERONNE HSP70 DANS L'ÉRYTHROPOÏÈSE INEFFICACE

des β -thalassémies majeures

JURY

Président :	Monsieur le Professeur William VAINCHENKER
Examinateurs :	Monsieur le Professeur Bruno VARET
	Monsieur le Professeur Yves BEUZARD
Rapporteurs :	Madame le Professeur Jeanne AMIEL
	Monsieur le Docteur Stany CHRÉTIEN
Directeurs de thèse :	Monsieur le Professeur Olivier HERMINE
	Docteur Geneviève COURTOIS

À ma femme Hélène, Pour l'amour quotidien que l'on partage Pour l'aide et le soutien indéfectibles que tu m'as apportés durant ces quatre années de thèse

À mon fils Eliot, Petit blond aux yeux bleus qui éclaire ma vie « Fais de ta vie un rêve, et d'un rêve, une réalité. » Le Petit Prince d'Antoine de Saint-Exupery

« La chance ne sourit qu'aux esprits bien préparés » Louis Pasteur La confiance en soi constitue le fondement de toute motivation et toute réussite.

Je dois beaucoup à **Olivier Hermine**, directeur de cette thèse.

C'est lui qui a su malicieusement préparer mon esprit à la recherche fondamentale et m'a donné la confiance nécessaire à l'aboutissement, je l'espère honorable, de ces années de thèse de sciences. Je réalise la chance qui m'est encore donnée de travailler avec lui et de le compter parmi mes amis.

Tu m'as permis de croire en ce que je voyais et de saisir la chance quand elle se présentait. Je suis maintenant habité (un peu, soyons modeste) par l'esprit « Herminien » de trouver une explication physiopathologique à toute chose, dérivée d'une observation méticuleuse.

Ce n'était pas gagné d'avance car j'étais bêtement réticent à « laisser tomber » mes patients pour passer mes journées à siffloter des airs de Jazz à mes érythroblastes en culture, week-end et jours fériés inclus.

Tu possèdes le grand talent et l'humble intelligence de tirer le meilleur de tes élèves aussi différents soient-ils, car tu as faite tienne la devise de St Exupéry :

« Si tu veux construire un bateau, ne rassemble pas tes hommes et femmes pour leur donner des ordres, pour expliquer chaque détail, pour leur dire où trouver chaque chose... Si tu veux construire un bateau, fais naître dans le cœur de tes hommes et femmes le désir de la mer. »

Je dois associer ici à ces remerciements le **professeur Bruno Varet** qui est la deuxième personne (ou plutôt la première, mais mon esprit n'était à l'époque pas encore bien prêt) à m'avoir fait entrevoir l'intérêt d'une recherche fondamentale accolée à l'exercice clinique. Je me souviens parfaitement de notre première rencontre dans votre bureau de l'hôpital Necker avant de prendre mes fonctions d'interne. Vous êtes le seul patron à m'avoir demandé mon classement à l'internat et si je comptais faire un DEA !

Votre rigueur intellectuelle et l'attention que vous portez à l'enseignement, aux patients et aux personnes me serviront encore longtemps de modèle.

La rencontre avec **Geneviève Courtois**, la co-directrice de ce travail, a été une grande chance.

C'est avec beaucoup de talent, d'efficacité et de simplicité que tu as conduit au jour le jour ce travail de thèse.

Tu as toujours été disponible dès les premières « manip » jusqu'à l'écriture du « papier », la relecture de la thèse et encore maintenant pour finir les dernières expériences nécessaires à la finalisation de ce travail. Tu as une vision perspicace des directions à prendre lorsque les problèmes se posent.

Ce fut un réel plaisir de partager ces quelques années avec toi.

Encore désolé d'avoir si souvent subrepticement échangé ton confortable fauteuil bleu avec mon moche fauteuil vert, mais c'était tellement tentant vu la proximité géographique de nos bureaux ne dépassant pas 50 cm !

Jean-Antoine Ribeil a une place spéciale dans ces remerciements car c'est lui qui m'a entraîné sur ce sujet et aurait dû figurer dans le jury. Ce travail est en effet la conséquence d'une idée qui a germé dans son esprit au cours de sa thèse de science dans le laboratoire. Cette collaboration scientifique arrive après déjà quelques années d'un travail clinique riche, fructueux et amical construit sur l'envie de développer et d'enrichir les soins aux patients drépanocytaires adultes et thalassémiques. Nous sommes un peu les Laurel et Hardy du monde des hémoglobinopathies ! Sache que j'apprécie particulièrement ton humour et notre numéro de duettiste.

Merci pour ton aide et ton soutien au cours de ces années.

Monsieur le Professeur William VAINCHENKER

Vous nous avez fait plaisir de suivre ce travail de thèse depuis plusieurs mois et de nous encourager.

Je tiens à vous remercier sincèrement pour l'honneur que vous nous faites de présider ce jury de thèse. Vous êtes pour moi l'étoile du petit prince, star scientifique incontestable de l'érythropoïèse et de la thrombopoïèse.

Madame le Professeur Jeanne AMIEL

Vous avez accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse avec beaucoup de gentillesse et d'enthousiasme bien que la thématique de ce travail soit relativement éloignée de vos sujets habituels de prédilection. Soyez-en ici remerciée.

Je n'ai pas oublié la réunion que nous avons eue avec Olivier Hermine, il y a quelques années, pour discuter du rôle d'Hsp70 dans la maladie d'Ondine. Cela a bien alimenté la discussion de cette thèse.

Votre regard critique de généticienne de haut niveau nous sera utile et nous espérons lancer sur cette thématique une collaboration au sein de l'IHU Imagine.

Monsieur le Docteur Stany Chrétien

C'est un véritable plaisir d'avoir dans ce jury un grand spécialiste de l'érythropoïèse et de GATA-1. Je vous suis reconnaissant d'avoir accepté de jeter votre œil expert et avisé sur ce travail de thèse.

Monsieur le Professeur Yves Beuzard

Vous faites partie des sages que l'on écoute avec toujours beaucoup de plaisir. Vous êtes la mémoire française vive de tant d'années d'études sur les hémoglobinopathies!

J'ai été ravi de faire votre connaissance et de profiter de votre érudition durant ces années de thèse.

Je tiens à remercier le **Dr Michel Dy**, toujours bienveillant, de m'avoir accueilli à deux reprises (pour mon DEA puis pour la thèse) dans son unité de recherche CNRS (UMR 8147).

On ne peut commencer à lire ces pages rébarbatives de thèse (enfin je l'espère pas trop quand même) sans remercier tous mes collègues de la « Hermine's Team ».

Je ne peux les citer tous sans en oublier quelques-uns, je m'excuse d'avance auprès de ceux qui ne seraient pas dans cette liste :

Amédée Renand (mon binôme de DEA qui m'a appris le Ficoll... et le verlan), Marie Bouillié (l'âme sensuelle du bureau, qui achète tout le monde à coup de nougats), Sophie Georgin-Lavialle (avec qui j'ai eu le double plaisir de travailler au labo et à l'HEGP, toujours prête à donner un coup de main efficace), Marie-Thérèse Rubio (ma co-interne et amie d'hémato), Zakia Bellaïd (la main sur le cœur), Michaël Dussiot (un chercheur gentil, compétent et acharné), Yvan Moura, Flavia Guillem, Julie Bruneau, David Sitbon, Francine Côté, Pascal Amireault, Tereza Coman, Maud Daveni, Julien Rossignol et enfin mon ami hématologue adulte de Necker, le Dr Richard Delarue.

Je tiens également à remercier ceux qui m'ont poussé à rentrer dans l'eau froide de la recherche fondamentale, mes maîtres de médecine interne les **professeurs Loïc Capron et Jacques Pouchot**. Merci aussi d'avoir permis mon retour dans le service comme praticien hospitalier et pour la confiance dont vous me gratifiez d'être votre élève.

Merci à Amélie Passeron et Brigitte Ranque et tous les chefs de clinique et internes qui ont assuré la prise en charge des patients dans le service de médecine interne de l'HEGP pendant mon absence.

Enfin, je ne peux oublier ici toute ma famille qui m'entoure avec tant d'amour : mes parents qui m'ont transmis le goût pour la médecine clinique et humaniste, mais aussi le goût et le sens des choses simples ; mon frère, Jérôme, avec qui je partage tant de bons moments musicaux ; ma sœur, Caroline, et mon beau-frère Xavier ainsi que leurs trois enfants, Chloé, Ninon et Juliette ; mes grands-parents modèles de réussite familiale, humaine et professionnelle ; et toute la tribu Arlet et Suau.

Une mention spéciale à Daniel André, mon beau-père qui a relu le manuscrit avec la grande gentillesse et le sens du travail bien fait qui le caractérisent. Merci pour cela, mais aussi pour cette excellente entente que nous partageons et ... pour m'avoir donné la main de ta fille.

RÉSUMÉ

La séquestration cytoplasmique d'Hsp70 par les chaînes d' α -globine libres est un mécanisme clé de l'érythropoïèse inefficace des β -thalassémies majeures (β -TM).

L'érythropoïèse inefficace joue un rôle central dans la physiopathologie de l'anémie des β-TM. Ses caractéristiques sont triple: accélération de la différenciation érythroïde, arrêt de maturation au stade d'érythroblaste polychromatophile et mort par apoptose à ce stade de différenciation. Les mécanismes précis de cette apoptose et de l'arrêt de la maturation n'ont pas encore été élucidés.

Il a été montré, au cours de l'érythropoïèse physiologique, que la protéine chaperonne Hsp70, en se localisant dans le noyau des érythroblastes en cours de différenciation, protège GATA-1 (facteur de transcription érythroïde majeur) de sa destruction par la caspase-3. Cette enzyme clé de l'apoptose est en effet activée physiologiquement au cours de la différenciation érythroïde et peut cliver GATA-1. Notre travail se base sur l'hypothèse suivante : Hsp70 pourrait, au cours de l'érythropoïèse des β -TM, être séquestrée dans le cytoplasme des érythroblastes matures (stade d'une intense hémoglobinisation) afin d'exercer son rôle de chaperonne des chaînes d' α -globine libres. Cela aurait comme conséquence néfaste l'absence de localisation nucléaire d'Hsp70 et, en conséquence, la destruction de GATA-1 à l'origine de l'arrêt de maturation et de la mort cellulaire.

Nous avons montré dans ce travail qu'Hsp70 était localisée principalement dans le cytoplasme des érythroblastes matures dans la moelle de patients β -TM, avec un défaut d'expression nucléaire. Par ailleurs, GATA-1 n'est plus exprimé dans ces cellules. Nous avons confirmé ces résultats dans un système de culture cellulaire érythroïde humaine en milieu liquide reproduisant les étapes de la différenciation érythroïde terminale. Une intéraction physique directe entre Hsp70 et l' α -globine a été identifiée par techniques de microscopie confocale, d'immunoprécipitation et de double hybride.

Enfin, la transduction dans les érythroblastes de β-TM d'un mutant d'Hsp70-S400A, principalement nucléaire, ou d'un mutant de GATA-1 non clivable par la caspase-3 corrige l'érythropoïèse inefficace.

Une modélisation mathématique du complexe Hsp70/ α -globine nous a permis de préciser les domaines impliqués dans l'intéraction, ce qui ouvre la voie à une possibilité de criblage de petites molécules permettant la rupture de ce complexe afin de ramener Hsp70 dans le noyau avec un espoir thérapeutique pour améliorer l'érythropoïèse inefficace des β -TM.

Mots clés: érythropoïèse inefficace, β-thalassémie majeure, Hsp70, GATA-1

Cytoplasmic sequestration of Hsp70 by excess of free α -globin promotes ineffective erythropoiesis in β -Thalassemia major (β -TM)

 β -TM is an inherited haemoglobinopathy caused by a quantitative defect in the synthesis of the β globin chains of haemoglobin, leading to the accumulation of free α -globin chains that form toxic aggregates. Despite extensive knowledge on the molecular defects causing β -TM, little is known about the mechanisms responsible for ineffective erythropoiesis (IE), which is characterised by accelerated erythroid differentiation, maturation arrest and apoptosis at the polychromatophilic stage. We have previously demonstrated that normal human erythroid cell maturation requires a transient activation of caspase-3. Although GATA-1, the master transcriptional factor of erythropoiesis, is a caspase-3 target, we have shown that during human erythroid differentiation, it is protected from cleavage through its association with the chaperone Hsp70 in the nucleus.

Hsp70 is constitutively highly expressed in normal human erythroid cells. The best-known role of this ubiquitous chaperone is to participate in proteins folding and refolding of proteins denatured by cytoplasmic stress, thus preventing their aggregation.

In this study, we have evidenced that during the maturation of human β -TM erythroblasts, Hsp70 is sequestrated in the cytoplasm by the excess of free α -globin chains, resulting in nuclear GATA-1 cleavage and, in turn, end-stage maturation arrest and apoptosis. A molecular modeling shows that α -globin binds to a highly electronegative cavity formed by all Hsp70 domains. Additionally, the transduction of a nuclear-targeted Hsp70 mutant (Hsp70-S400A) or caspase-3 uncleavable GATA-1 mutant (μ GATA-1) corrects β -TM ineffective erythropoiesis in human cultured β -TM cells.

Our data indicate that cytosolic Hsp70 sequestration by α -globin chains prevents its nuclear localization and is a key mechanism of the β -TM IE. In order to increase nuclear Hsp70 translocation, developing small molecules that could increase Hsp70 expression or disrupt the Hsp70/ α -globin complex could be a novel approach of targeted therapies to improve erythropoiesis in β -TM.

Keywords: ineffective erythropoïesis, β-thalassemia major, Hsp70, GATA-1

Liste des abréviations

ABD : ATPase binding domain of Hsp70 aussi denommé NBD Nucleotide Binding Domain

AIF : apoptosis inducing factor AHSP : α-Hemoglobin–stabilizing protein Bcl-XL : B cell lymphoma-XL BFU-E : burst forming unit-erythroid CAD : caspase activated DNase CD34. 36 : cluster of differentiation 34 ou 36 CFU-E : colony-forming unit-erythroid CFU-GEMM : colony-forming unit-granulocyte erythroid macrophage mixed CFU-GM : colony-forming unit-granulocyte-macrophage CFU-M : colony-forming unit-macrophage CFU-MK : colony-forming unit-megakaryocyte DISC : death-inducing signalling complex Epo: érythropoïétine Epo-R : récepteur à l'érythropoïétine FOG-1 : friend of GATA-1 GATA-1 : aussi appelé Eryf-1, NF-E1, NF-1 et GF-1 : GATA binding factor 1 ou ervthroid transcription factor GDF15 : growth differentiation factor 15 GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor GPA : alycophorine A Hb : hémoalobine HbF : hémoglobine fœtale HDAC : histones déacétylases HIF-1 : hypoxia inducible factor-1 HSF : heat shock factors HSE : heat shock element Hsp: heat shock protein HRI : heme regulated inhibitor of translation IL-3, IL-6...: interleukine-3, -6 IPOD : insoluble protein deposits JUNQ : juxtanuclear quality control compartment LAM : leucémie aigue myéloïde NBD: Nucleotide Binding Domain of Hsp70 appelé aussi ABD : ATPase binding domain PBD : peptide binding domain aussi dénommé SBD Substrate Binding Domain ROS : reactiv oxygen species SBD: Substrate Binding Domain of Hsp70 aussi dénommé PBD (peptide-binding domain) SCF : stem cell factor SLA : sclérose latérale amyotrophique TGF- β : transforming growth factor β TNF-R : tumor necrosis factor receptor death-inducing signalling complex DISC TRAIL : TNF-related apoptosis induced ligand Tpo: thrombopoïétine

TWSG1 : twisted gastrulation protein homolog

Lexique

La sémantique ou terminologie concernant la différenciation érythroïde terminale, sujet au centre de cette thèse, est parfois confuse, de même que la dénomination des différentes sous-unités composant l'hémoglobine. Nous proposons donc ici quelques définitions qui peuvent contribuer à mieux comprendre le sujet.

Érythropoïèse

Différenciation érythroïde terminale ou érythropoïèse tardive : stades de différenciation médullaire de la lignée rouge allant du proérythroblaste au réticulocyte.

<u>Maturation</u> terminale ou finale : derniers stades de cette phase. Passage de l'érythroblaste polychromatophile à l'érythroblaste acidophile puis au réticulocyte. Stades où les cellules ne prolifèrent plus.

Nous avons donc, pour nos travaux, défini un index de maturation terminale (IMT ou *terminal maturation index* TMI) :

% de cellules hyper-matures (acidophiles+réticulocytes) × 100

% de polychromatophiles

Hémoglobine

<u>Ontogénie des chaînes de globine</u> = permutation ou « switch » des chaînes de globine au cours de la vie fœtale et ex-utero. Nous conserverons ce terme Anglais de « switch ».

<u>**Hème**</u> : molécule constituée de protoporphyrine IX et de son dérivé ferreux Fe^{2+} (= fer réduit) <u>**Hémine**</u> ou hématine : molécule constituée de protoporphyrine IX et de son dérivé ferrique Fe^{3+} (= fer oxydé)

<u>Hémoglobine</u> : constituée de 4 molécules d'hèmes et 2 paires de chaînes de globine <u>Méthémoglobine</u> : hémoglobine constituée de fer oxydé. La méthémoglobine, en l'absence de réduction du fer par la méthémoglobine réductase, va se dénaturer en hémichromes qui peuvent ensuite former des agrégats.

Sous unité de l'hémoglobine : exemple des chaînes α

- **apo α-globine** : α-globine libre sans hème
- holo α-globine : α-hémoglobine, deux sous-formes
 - o forme réduite avec fer ferreux Fe^{2+} (« vraie » α-hémoglobine)
 - o forme oxydée avec fer ferrique Fe³⁺ (qu'on pourrait appeler αméthémoglobine). Cette forme peut aboutir à des hémichromes (hémoglobine oxydée et dénaturée)

<u>**Hémichromes**</u>: hémoglobines sous forme de tétramère (entières) ou de sous-unité de chaînes de globine avec hème oxydé sous forme ferrique (Fe^{3+}), **et** ayant subi une dénaturation

Sigles utilisés pour dénommer les β-thalassémies :

 β^{0} absence totale de production de chaînes β

 β^* production présente mais diminuée de chaînes β (le pourcentage de production est très variable en fonction des mutations ou autres polymorphismes génétiques)

 β^{E} mutation E : substitution d'un acide glutamique par une lysine sur la chaîne β . Les patients EE (β^{E}/β^{E}) ou AE (β/β^{E}) sont asymptomatiques. L'association à une mutation β -thalassémique β^{0} (β^{0}/β^{E}) est responsable d'une β -thalassémie intermédiaire ou majeure.

SOMMAIRE

RESUME.		
LISTE DE	S ABREVIATIONS	
LEXIQUE		14
~ AVANT PI	ROPOS	
INTRODU	<i>CTION</i>	
1. Hsp7() et son rôle au cours de l'érythropoïèse physiologique	
1.1.	Les protéines de choc thermique (Hsp)	18
1.2.	Hsp70 : structure et fonction	19
1.2.1.	Expression et structure d'Hsp70	19
1.2.	1.1. Expression tissulaire d'Hsp70	19
1.2.	1.2. Structure	2
1.2.2.	Rôle cellulaire d'Hsp70	2
1.3.	Rôle d'Hsp70 au cours de l'érythropoïèse physiologique	2:
1.3.1.	Rappel sur l'érythropoïèse physiologique	2:
1.3.2	GAIA-1 et son röle majeur dans la différenciation érythroïde terminale	
1.3.3.	Regulation de l'erythropoiese physiologique par les caspases	
1.3.4.	Induction et prevention de l'apoptose dans les cellules erythroides : Fas/Fas-ligand et d	Hsp/0.3
1.3.	4.1. Fas/Fas-figand dans la differenciation erythroide	
1.3.	4.2. Role d fisp/0 dans I eryinopolese physiologique	
1.	3.4.2.2 Régulation de la localisation exto-nucléaire d'Hsn70	
1.1	Hsn70 au cours de l'érythronoïèse nathologique	
1.4.	Excès de sortie nucléaire: la myélodysplasie	4
1.1.1.	Défaut d'entrée nucléaire : la B-thalassémie majeure	1 4'
1.4.2.	Rôle d'Hsp70 et de Bag-1 au cours de l'anémie de Blackfan- Diamond	
1.5.	Résumé de la régulation de l'érythropoïèse terminale humaine	
2. Synth	èse de l'hémoglobine, ontogénie de l'hémoglobine	
2.1.	Intérêt de l'hémoglobine dans les globules rouges	
2.2.	Structure générale de l'hémoglobine	
2.3.	Différents types d'hémoglobine humaine	47
2.4.	Les chaînes de globines : ontogénèse, régulation génique des chaînes	
2.4.1.	Differents types de chaines de globines	
2.4.2.	Ontogenese de l'hemoglobine et regulation des genes de la globine	
2.4.3.	Regulation dels genes de globine : LCK et HS40	
2.4.4.	Kegulation de la commutation entre nemogrobine fictale et aduite	
2.4.4	4.1. Interet inerapeutique du « switch » des chaines de groomes	
2.4.4	4.3. Rôle des facteurs de croissance sur l'expression des chaînes γ de globine	
3. L'érv	thropoïèse inefficace des β-thalassémies majeures	
3.1.	Les β-thalassémies	
3.2.	Anémie des β-thalassémies	
3.3.	Dysérythropoïèse des β-thalassémies	6
3.3.1.	Caractéristiques de la dysérythropoïèse des β-thalassémies	6
3.3.1	1.1. Historique	6
3.3.1	1.2. Caractéristiques de la dysérythropoïèse	63
3.3.2.	Mécanisme de mort cellulaire des érythroblastes β-thalassémiques : l'apoptose	64
3.3.3.	Voies d'apoptose impliquées dans les β-thalassémies	6.
3.3.4.	Rôle des dérivés oxydants (ROS) dans la physiopathologie de la thalassémie	66

3.3.5. L'anomalie de structure membranaire pourrait-elle expliquer la mortalité cellulaire au stade	e
polychromatophile ?	68
3.3.6. Rôle de la chaperonne AHSP (α -Hemoglobin–stabilizing protein)	
3.3.7. Role de l'heme et des inhibiteurs de l'heme	75
3.3.8. Role des cytokines inflammatoires ($INF-\alpha$; $IGF-\beta$)	77
3.3.9.1 Augmentation du nombre de macronhages et de leur activation	79 79
3 3 9 2 Réponse à l'érythronoïètine altérée	79
3.3.9.3. Surcharge martiale	80
3.3.9.4. Déficit en acide folique	81
HYPOTHESES ET OBJECTIF	83
RESULTATS	86
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	117
1. Analyse critique des résultats	117
2. Hypothèses pour de nouvelles recherches découlant de ce travail	122
2.1. Hsp70 joue-t-elle un rôle physiologique dans l'assemblage de l'hémoglobine?	122
2.2. La séquestration cytoplasmique d'Hsp70 avec absence de localisation nucléaire:	
un modèle dans les maladies neurodégénératives?	126
2.3. Rôle d'autres chaperonnes, notamment Hsp90	132
2.4. Accélération de la différenciation érythroïde des β-thalassémies: une caractéristique non	100
expliquée par Hsp/0	132
2.5. l'adieau recapitulatit des perspectives de travail	136
CONCLUSION	138
ANNEXES	139
ANNEXE 1 : Revue générale sur la dysérythropoïèse β -thalassémique	140
ANNEXE 2 : Autres articles sur le sujet	151
ANNEXE 3 : Présentation à des congrès. Prix	151
BIBLIOGRAPHIE	152

AVANT PROPOS

Les β -thalassémies font partie, avec la drépanocytose, des maladies génétiques les plus répandues au monde. Au cours des β -thalassémies majeures, il n'y a plus ou très peu de production de chaînes de β -globine ce qui entraîne un excès de chaînes d' α -globine libres, qui normalement s'associent aux chaînes de β -globine pour former le tétramère d'hémoglobine. La synthèse d'hémoglobine (hémoglobinisation) a lieu dans la moelle osseuse, au cours de la différenciation érythroïde terminale. L'excès de chaînes d' α -globine dans les érythroblastes matures entraîne leur précipitation, toxique pour la cellule, et est associé à l'arrêt de maturation et la mort par apoptose de ces cellules. Il en résulte une anémie profonde des patients, qu'il est nécessaire de transfuser mensuellement tout au long de leur vie. Les mécanismes de toxicité des chaînes d' α -globine pour les érythroblastes matures ne sont pas précisément connus. Pourtant de nombreuses revues de la littérature ont été publiées sur l'érythropoïèse inefficace des β -thalassémies ces quinze dernières années, mais ces écrits confondent très souvent des mécanismes physiopathologiques de toxicité de l' α -globine sur les globules rouges (travaux les plus nombreux) avec la toxicité sur les érythroblastes, peu étudiée. Cela mérite une présentation critique des données de la littérature qui sera faite en introduction.

Notre travail s'est centré sur le rôle de la chaperonne Hsp70 au cours de l'érythropoïèse inefficace des β -thalassémies majeures. Le rôle ubiquitaire de cette chaperonne est d'éviter que des protéines mal formées ne soient toxiques pour les cellules. Hsp70 étant exprimée constitutivement à forte concentration au cours de l'érythropoïèse, il était logique d'étudier son implication dans une maladie où des peptides toxiques s'accumulent dans les érythroblastes.

Nous avons souhaité, dans la première partie de cette thèse, « planter le décor » en présentant les caractéristiques de la protéine Hsp70, dont notre équipe est, à ce jour, la seule au monde à étudier son rôle dans l'érythropoïèse humaine. Nous résumerons donc 10 ans d'études de cette protéine dans notre laboratoire en pointant les données bien établies et les zones d'ombre qui persistent. Nous présenterons ensuite les grandes phases de l'érythropoïèse physiologique en axant le propos sur la synthèse d'hémoglobine au cours de la maturation érythroïde et sur le facteur de transcription fondamental de l'érythropoïèse GATA-1, protégé dans le noyau par Hsp70. Nous terminerons cette introduction par une analyse critique de la littérature sur l'érythropoïèse inefficace des β -thalassémies qui a fait aussi l'objet d'une publication proposée en annexe.

La méthodologie et les résultats de ce travail de thèse seront proposés sous forme du manuscrit en cours de révision dans la revue *Nature*.

INTRODUCTION

1. Hsp70 et son rôle au cours de l'érythropoïèse physiologique

1.1. Les protéines de choc thermique (Hsp)

Les protéines de choc thermique (Heat shock proteins-Hsp) ont été découvertes au début des années 60. (Ritossa, Exp. Cell Res. 1964) Elles sont constitutives de certaines cellules et/ou inductibles par un stress cellulaire afin de protéger ces cellules des lésions engendrées par ce stress. (Garrido, Cell Cycle 2006 ; Mjahed, Exp. Cell Res. 2012 ; Ellis, Biochem. Soc. Symp. 1989) Les stress peuvent être physique (température), métabolique (l'hypoxie, l'altération de l'ADN, l'accumulation de protéines mal repliées) ou chimique (l'oxydation cellulaire par les ROS, les drogues cytotoxiques, la variation de pH cellulaire...).

On distingue :

- les Hsp de haut poids moléculaire (Hsp100, 90, 70, 60, le chiffre indiquant le poids moléculaire en kilo Daltons) qui sont dépendantes de l'ATP et nécessitent des co-chaperonnes pour leur fonction et,

 les Hsp de bas poids moléculaire, variant entre 15 et 30 kDa (dont Hsp27), ATP indépendantes. (Garrido, Cell Cycle 2006; Mjahed, Exp. Cell Res. 2012)

Lors d'un stress, des facteurs de transcription cytosolique sous forme monomérique à l'état basal, les HSF (Heat Shock Factors) 1 ou 2 (suivant le type de stress), s'oligomérisent (trimérisation) sous l'effet de phosphorylations, ce qui leur permet d'être transférés dans le noyau et de se fixer à des séquences consensus spécifiques, les HSE (Heat Shock Element). Les HSE sont localisés dans les régions régulatrices des gènes « heat shock » situées sur le bras court du chromosome 6 (6p21.3), dans la région III du Complexe Majeur d'Histocompatibilité. Il semble que les facteurs HSF 1 et 2 régulent aussi l'expression de nombreux autres gènes. Un rétrocontrôle négatif existe : des concentrations élevées d'Hsp70 empêchent la trimérisation des HSF.

1 Q

1.2. Hsp70 : structure et fonction

1.2.1. Expression et structure d'Hsp70

Il faudrait plutôt parler de la famille des Hsp70 qui sont des protéines de poids moléculaires variant entre 66 et 78 kDa, hautement conservées tout au long de l'évolution, dans toutes les cellules, des bactéries aux plus grands eucaryotes. Il a été décrit 17 gènes et 30 pseudogènes pour Hsp70 dans le monde animal et végétal. Chez l'homme, il existerait 6 gènes et 27 pseudogènes (Brocchieri, BMC Evol. Biol. 2008), mais de nouveaux gènes sont régulièrement identifiés.

1.2.1.1. Expression tissulaire d'Hsp70

Hsp70 dont nous parlons dans ce travail est aussi nommée Hsp72 ou HspA1. C'est une protéine chaperonne ubiquitaire pas ou peu exprimée chez l'homme, à l'état physiologique, dans les cellules de l'organisme si elle n'est pas induite par un stress. Toutes les cellules peuvent cependant l'exprimer.

Hsp70 est par contre fortement et constitutivement exprimée, en pathologie, dans des cellules cancéreuses (cancers solides et maladies hématologiques malignes, leucémies aiguës ou chroniques, lymphomes...) (Mjahed, Exp. Cell Res. 2012) et dans les neurones au cours de maladies neurologiques dégénératives parfois appelées « maladie des protéines mal-repliées » ou « protein misfolding diseases or disorders ». Dans ces pathologies (maladie de Parkinson, d'Alzheimer, d'Huntington, sclérose latérale amyotrophique, maladies à prions), les protéines défectueuses forment des agrégats cytoplasmiques qu'Hsp70 va tenter d'éliminer ou, au moins, contribuer à réduire leur toxicité potentielle. (Aridon, Neurodegener Dis. 2011, Broadley, FEBS Letters 2009 ; Sharma, Curr. Protein Pept. Sci. 2009)

Il a été montré, notamment par notre laboratoire, qu'Hsp70 était exprimée constitutivement, ce qui est une exception pour cette chaperonne, dans le cytoplasme et le noyau des érythroblastes humains normaux. Son expression s'accroît au cours de la différenciation (Ribeil, Nature 2007; Frisan, Blood 2012; Singh, Nature 1984), jusqu'au stade réticulocyte où son expression diminue très notablement (données personnelles), pour être très faible dans les globules rouges.

(Singh, Nature 1984 et données personnelles) L'expression constitutive d'Hsp70 dans la lignée rouge avait en réalité été montrée pour la première fois en 1982 sur des lignées érythroïdes humaines K562 mais aussi dans de la moelle humaine. (Singh, Nature 1984) Elle a été également démontrée dans diverses espèces animales, particulièrement étudiée chez le poulet (Morimoto, J. Cell Biol. 1984; Banerji, Genes Dev. 1987; Winning, Dev. Biol. 1988) où l'expression augmente au la maturation pour être maximale stade cours de au d'érythroblaste polychromatophile, puis décline progressivement avec la maturation des réticulocytes et des globules rouges. (Banerji, Genes Dev. 1987)

Notons qu'il a été aussi montré dans notre laboratoire que les chaperonnes Hsp27 et Hsp90 étaient exprimées constitutivement dans le cytoplasme d'érythroblastes humains, mais pas dans leur noyau. (Ribeil, Nature 2007) Hsp60 serait aussi exprimée dans les érythroblastes humains. (Hristoskova, Exp. Cell Res. 2007) Il n'existe par contre, à ce jour, aucune donnée sur l'expression d'Hsp70 dans les érythroblastes de souris. Concernant les co-chaperonnes d'Hsp70, une seule étude très récente s'est intéressée à l'expression de la co-chaperonne **Bag-1**, présente dans les érythroblastes humains et murins. (Horos, Blood 2012)

Enfin, l'expression des Heat Shock Factors 1 et 2 facteurs de transcription des Hsp au cours de l'érythropoïèse n'a pas été encore étudiée.

1.2.1.2. Structure (figure 1)

Hsp70 est formée de deux domaines: le domaine N terminal de liaison nucléotidique à l'ATP (Nucleotide Binding Domain-NBD, aussi dénommé NH2-terminal ATPbinding domain-ABD) de 45 kDa et le domaine fixant son substrat, Substrate Binding Domain (SBD), de 25 kDa, comportant une partie C-terminale hélicoïdale de 10 kDa formant un sous-domaine en forme de couvercle, « lid » en anglais (Figure 1). Le SBD est aussi parfois appelé le « COOH-terminal peptide-binding domain (PBD) ». Par rapport aux autres chaperonnes qui agissent en dimères (Hsp90) ou oligomères (Hsp27), Hsp70 joue son rôle physiologique sous forme de monomère. (Mjahed, Exp. Cell Res. 2012) Le substrat se fixe classiquement par ses régions hydrophobes exposées, à la partie SBD d'Hsp70 qui, en conformation ouverte (ATP-Hsp70), est peu affine pour son substrat. Cette fixation peut alors entraîner l'hydrolyse de l'ATP en ADP de la partie NBD, grâce à l'action de co-chaperonnes (notamment Hsp40). Cela va modifier la structure d'Hsp70 qui referme son « couvercle » permettant d'augmenter alors l'affinité avec son substrat (ADP-Hsp70). (Broadley, FEBS Letter 2009) Inversement, la transformation d'ADP en ATP par d'autres co-chaperonnes (comme Bag-1) va rouvrir Hsp70 et libérer le substrat.

La structure 3D cristallographique totale d'Hsp70¹⁻⁷⁰¹ (701 résidus) humaine n'est pas parfaitement déterminée. En effet, la structure cristallographique de la partie NBD est décrite chez l'homme depuis le début des années 2000 (Wisniewska, PLoS ONE 2010 ; Osipiuk, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 1999), mais il reste à déterminer, chez l'homme, la structure du SBD et de la protéine totale que ce soit dans sa forme ouverte (ATP) ou fermée (ADP). La structure cristallographique entière d'Hsp110 *Saccharomyces cerevisiae*, un homologue très proche d'Hsp70, qui est d'ailleurs une co-chaperonne d'Hsp70, a été récemment découverte et sert jusqu'à présent de modèle pour les études de la structure d'Hsp70 humain. (Liu, Cell 2007) Ce sont ces différents modèles de structure décrits dans la littérature qui nous permettront d'étudier dans cette thèse l'intéraction entre Hsp70 et l' α -globine par des modèles mathématiques basés sur les homologies de structures et les descriptions structurales partielles de cette protéine (domaine NBD humain, SBD du *rat ou d'E. Coli*) ou de la protéine entière humaine homologue (Hsp110).



<u>Figure 1</u> : Structure d'Hsp70 et ses 2 domaines : NBD et SBD qui comprend la partie lid hélicoïdale (couvercle) (d'après le site « Hsp information resources » http://pdslab.biochem.iisc.ernet.in/hspir)

1.2.2. Rôle cellulaire d'Hsp70

Le rôle ubiquitaire d'Hsp70 dans le monde animal est triple (Hartl, Nature 2011) :

- Aide à la synthèse peptidique et au transport transmembranaire de protéine. Hsp70 permet à des protéines nouvellement formées de se replier correctement, dès leur sortie du ribosome, afin de se présenter dans une conformation structurelle tridimensionnelle (forme native) leur permettant la fonction, la liaison à d'autres protéines ou le transport transmembranaire ;
- 2. Cytoprotection cellulaire contre des protéines malformées ou dénaturées :
 - Hsp70 prend en charge des protéines mal formées, dénaturées (« misfolding proteins ») afin de tenter de les remettre dans une conformation physiologique, native, pour éviter qu'elles ne forment des agrégats potentiellement toxiques pour la cellule
 - Hsp70 participe à l'élimination d'agrégats qui n'auraient pas pu être évités par la phase précédente par la voie du protéasome, avec l'aide d'autres co-chaperonnes (notamment Hsp40, 110, et les protéines HIP, HOP, BAG-1 et BAG-3. (Hartl, Nature 2011 ; Mjahed, Exp. Cell Res. 2012)

De plus, il a bien été démontré, dans divers types cellulaires, depuis 15 ans que toutes les Hsp et particulièrement Hsp70 avaient des fonctions **anti-apoptotiques**, de survie, de prolifération et de différenciation cellulaire. (Lanneau, J Cell Mol Med 2008 ; Mjahed, Exp. Cell. Res. 2012 ; Ribeil, Nature 2007) Divers stimulus pro-apoptotiques peuvent induire une forte expression d'Hsp70. (Gorman, FEBS Lett. 1999) Par ailleurs, Hsp70 protège les cellules de l'apoptose en agissant à la fois en amont (Park, EMBO J. 2001; Stankiewicz, J. Biol. Chem. 2005) et en aval (Buzzard, J. Biol. Chem. 1998) de l'activation de la cascade des caspases par diverses intéractions avec des protéines de l'apoptose. Par exemple, Hsp70 bloque la translocation de Bax dans la membrane mitochondriale (Stankiewicz, J. Biol. Chem. 2005), inhibe Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1), ce qui empêche la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase-9. (Beere, Nat. Cell Biol. 2000 ; Saleh, Nat. Cell Biol. 2000) Enfin Hsp70 peut s'associer directement à AIF (Apoptosis Inducing Factor) relargué dans le cytoplasme cellulaire lors de la dépolarisation mitochondriale ; ce qui inhibe la translocation nucléaire d'AIF,

pourvoyeur d'une condensation de la chromatine lorsqu'il atteint sa cible nucléaire. (Ravagnan, Nat. Cell Biol. 2001)

Ces fonctions anti-apoptotiques cytoplasmiques d'Hsp70 n'ont pratiquement pas été étudiées à ce jour au cours de l'érythropoïèse si ce n'est une seule étude qui montre qu'Hsp70 séquestre AIF dans le cytoplasme de lignées érythroïdes humaines TF-1. (Lui, FEBS Lett. 2007)

Les modulations de l'apoptose par Hsp70 par d'autres mécanismes antiapoptotiques que nous ne détaillerons pas ici ont été essentiellement démontrées dans les cellules cancéreuses et non dans les cellules érythroïdes. Ils sont schématisés dans la figure 2



Figure 2: Cibles moléculaires d'Hsp-70 expliquant son rôle anti-apoptotique dans les cellules cancéreuses (d'après Brierley-Hobson, Bioscience Horizons 2008)

1.3. Rôle d'Hsp70 au cours de l'érythropoïèse physiologique

1.3.1. Rappel sur l'érythropoïèse physiologique

La production des érythrocytes représente le plus haut rendement du système hématopoïétique, avec une production d'environ 200 milliards de globules rouges par jour (2 millions par seconde) qui compensent les pertes quotidiennes et la destruction des globules rouges vieillis (hémolyse physiologique). Cela nécessite donc un contrôle très fin pour éviter un déficit de production (aboutissant à une anémie) ou l'excès de production conduisant à une polyglobulie. En cas de besoins accrus, l'érythropoïèse peut s'adapter et produire 7 à 8 fois plus d'érythrocytes.

L'érythropoïèse est un processus de maturation cellulaire continue dérivant des cellules souches hématopoïétiques (HSC, Hematopoietic Stem Cells), progéniteurs les plus précoces de l'hématopoïèse. Ces cellules sont quantitativement peu nombreuses : environ 0,05% des cellules de la moelle osseuse et 1% des cellules du sang placentaire. Elles sont caractérisées par un fort taux d'auto-renouvellement (Ema, Curr. Opin. Genet. Dev. 2003), le marquage CD34⁺ et leur caractère pluripotent (pouvant donner naissance à toutes les cellules hématopoïétiques). (Szilvassy, Exp. Hematol. 2003)

L'érythropoïèse peut être schématiquement divisée en deux étapes (figure 3):

1.3.1.1. L'érythropoïèse précoce

C'est la phase pendant laquelle une cellule souche hématopoïétique médullaire restreint sa multipotence et s'engage dans la voie de la lignée rouge.

Cette érythropoïèse précoce a été analysée grâce à la capacité des progéniteurs érythroïdes de former en caillot de plasma de bœuf (Arthur A. AXELRAD, 1974), puis en culture semi-solide de methyl-cellulose, *in vitro*, des colonies d'érythroblastes matures (Gregory, Blood 1978). Elle est très dépendante du facteur de croissance « Stem cell facteur » (SCF) dont le récepteur cellulaire, c-kit est exprimé à la surface de ces cellules.

Elle comprend :

- les CFU-GEMM (« Colony Forming Unit Granulocyte-Erythroid-Megakaryocyte-Macrophage »), progéniteurs myéloïdes multipotents à l'origine de colonies mégacaryocytaires, granulo-monocytaires et érythroïdes.

- les BFU-E/Mk (« Burst Forming Unit-Erythroid and Megakaryocyte »), progéniteurs possédant la double potentialité érythroïde et mégacaryocytaire.

- les BFU-E immatures (« Burst Forming Unit-Erythroid »), premiers progéniteurs engagés irréversiblement dans la lignée érythroïde. Ces précurseurs génèrent de grosses colonies érythroïdes contenant des globules rouges après 15 jours de culture *in vitro* en milieu semi-solide (chez l'homme). Les marqueurs de différenciation de ces progéniteurs sont CD34⁺, CD33⁺, HLA-DR⁺, c-kit⁺ et GpA⁻. Ils sont dépendants du SCF et d'autres facteurs de croissance hématopoïétiques pour leur prolifération et leur différenciation, mais n'expriment pas ou peu le récepteur à l'Epo : Epo-R.

 - Les BFU-E matures forment des colonies érythroïdes matures *in vitro* chez l'homme après 10 jours de culture en présence d'IL-3, de SCF et d'Epo. À ce stade, les cellules n'expriment plus le CD33 et l'Epo-R apparaît à leur surface. (Broudy, Blood 1991)

- Les CFU-E (« Colony Forming Unit Erythroid »), progéniteurs les plus matures de cette phase qui, en 7 jours de culture en méthylcellulose en présence d'Epo, vont produire de petites colonies (<50 cellules) d'érythroblastes matures contenant des globules rouges. Ces progéniteurs expriment à leur surface Epo-R, le CD36, le récepteur à la transferrine CD71 et c-kit mais sont négatives pour la GpA. (Broudy, Blood 1991)

Sur un frottis médullaire, ces différents précurseurs ne représentent qu'un faible pourcentage des cellules nucléées (1% environ), et ne possèdent aucun caractère cytologique propre qui permette de les différencier à la coloration en May Grünwald-Giemsa (MGG) (cellules de taille moyenne à haut rapport nucléo-cytoplasmique contenant une chromatine fine).



Figure 3 : Deux phases de l'érythropoïèse. Érythropoïèse précoce et tardive (ou différenciation érythroïde terminale) avec l'expression des marqueurs principaux de différenciation. CD *cluster of differentiation* ; Hb *hémoglobine* ; ProE *proérythroblaste* ; Baso *basophile* ; Poly *polychromatophile* ; Acido *acidophile* ; Ret *réticulocyte* ; GR *globule rouge ou érythrocyte*.

1.3.1.2. L'érythropoïèse tardive

1.3.1.2.1. Stade des érythroblastes morphologiquement identifiables L'érythropoïèse tardive ou différenciation érythroïde terminale correspond à la phase de différenciation finale des progéniteurs CFU-E sous la dépendance essentielle de l'érythropoïétine (Epo). Cette phase est marquée à la fois par l'acquisition des caractéristiques cytologiques et phénotypiques spécifiques de la lignée rouge mais aussi par une expansion massive initiale. C'est le stade de différenciation cellules morphologiquement identifiables en de la lignée érythroblastique : les proérythroblastes (dérivant directement des progéniteurs CFU-E) se différencient successivement en érythroblastes basophiles, polychromatophiles et acidophiles (appelés aussi, par les Anglo-Saxons, orthochromatiques) (Figure 3). L'énucléation de l'érythroblaste acidophile donne naissance au réticulocyte qui migre dans la circulation sanguine où il mature, en 2 à 3 jours, en globule rouge.

L'ensemble de ces cellules (du proérythroblaste au réticulocyte) constitue la lignée érythroblastique morphologiquement identifiable sur la moelle osseuse humaine par coloration MGG et représente **20 à 30%** des cellules nucléées d'un myélogramme.

1.3.1.2.2. Cinétique et durée de l'érythropoïèse terminale

Du stade proérythroblaste au stade d'érythroblaste basophile, les précurseurs prolifèrent, on considère que ce sont des érythroblastes immatures.

À partir du stade polychromatophile, les érythroblastes continuent leur maturation, mais la prolifération s'arrête. On parlera à partir de ce stade, dans cette thèse, de maturation terminale (cf lexique). Du stade pro-érythroblaste à l'acidophile il existe 16 divisions (8 à 32).

La durée de l'érythropoïèse normale du proérythroblaste au réticulocyte est de 7 jours, mais peut être raccourcie en cas de besoin.

Les globules rouges ont une durée de vie moyenne de 120 ±4 jours (½ vie moyenne de 28 jours).

1.3.1.2.3. Hémoglobinisation, changement tinctorial et de pH

Les érythroblastes subissent des transformations morphologiques comprenant une réduction du volume cellulaire et celui du noyau avec condensation de la chromatine. Le changement de pH du cytoplasme explique son changement de couleur à la coloration MGG. Ce changement tinctorial s'explique par la perte progressive, au cours de la différenciation, d'acides ribonucléiques (ARN) (responsables initialement de la basophile) mais aussi par l'augmentation progressive de la concentration de l'hémoglobine, dont la synthèse débute au stade proérythroblaste (très faible concentration à ce stade, puis augmente à partir du basophile). (Thorell, Acta Pathol. Microbiol. Scand. 1948 ; Borsook, Nature 1962) L'hémoglobine donne au cytoplasme devenu basique son affinité pour l'éosine (qui est un composant acide), donnant donc une couleur rose pâle-orangée aux érythroblastes acidophiles, stade où l'hémoglobine a atteint sa concentration cytoplasmique maximale (environ 95% de la synthèse d'hémoglobine est acquise à ce stade). (Sondhaus, Blood 1960) Le

polychromatophile est la cellule de transition entre le basophile et l'acidophile. C'est la cellule dans laquelle augmente le plus fortement la concentration en hémoglobine, ce qui est un fait déterminant pour la suite de notre travail. Ces travaux sur la synthèse de l'hémoglobine selon les stades de maturation érythroïde sont très anciens et un peu oubliés, étalés entre les années 1940 et la fin des années 1960.

1.3.1.2.4. Marqueurs de surfaces des érythroblastes

Le proérythroblaste exprime des antigènes de différenciation comme le récepteur à la transferrine (CD71), le CD36, le c-Kit et l'Epo-R. C'est la cellule exprimant le plus fortement l'Epo-R, la concentration baissant dans les stades suivant pour être nulle sur les réticulocytes. (Broudy, Blood 1991)

Les cellules vont acquérir ensuite la glycophorine A (GPA), dont l'expression augmente au fur et à mesure de la maturation érythroïde terminale tandis que celle de c-kit diminue au stade basophile pour disparaître totalement aux stades polychromatophile et ultérieurs. (Uoshima, Br. J. Haematol. 1995; Testa, Blood 1996) (figure 3)

1.3.1.2.5. Environnement cytokinique et érythropoïèse

Comme nous l'avons vu ci-dessus, diverses cytokines jouent un rôle crucial dans la régulation positive de l'érythropoïèse. Elles sont principalement produites par les cellules du stroma médullaire, fibroblastes, adipocytes, cellules endothéliales, mais aussi par les cellules hématopoïétiques, notamment les macrophages de l'îlot érythroblastique, entourant, dans la moelle les érythroblastes en différenciation, ou encore les lymphocytes. D'autres organes que la moelle osseuse peuvent aussi produire des facteurs de croissance, particulièrement le foie et les reins pour la Tpo et l'Epo, respectivement. Ces cytokines peuvent exercer un contrôle positif sur l'érythropoïèse en activant des signaux de prolifération ou de survie (comme l'Epo), ou au contraire accélérer la maturation érythroïde terminale. C'est le cas du TGF- β «Transforming Growth Factor β »). (Zermati, Exp. Hematol. 2000 ; Krystal, J. Exp. Med. 1994) *In vitro,* le TGF- β inhibe l'érythropoïèse précoce en diminuant le nombre de BFU-E. (Hino, Br. J. Haematol. 1988 ; Krystal, J. Exp. Med. 1994) Par ailleurs, le

TGF-β ne provoque pas l'apoptose mais inhibe l'érythropoïèse tardive (1) en bloquant la prolifération cellulaire, en ralentissant le cycle des cellules érythroïdes immatures (proérythroblastes) et (2) en accélérant la différenciation des progéniteurs érythroïdes jusqu'aux acidophiles et réticulocytes. (Zermati, Exp. Hematol. 2000) Enfin, cette phase de différenciation érythroïde terminale nécessite la présence de micronutriments : fer et vitamine B6 pour la synthèse d'hémoglobine, vitamines B9 (folates) et B12 pour la synthèse d'ADN, alors que des stades plus précoces (érythropoïèse primitive) nécessitent un environnement hormonal androgénique.

Toute cette phase de différenciation terminale est sous la dépendance du facteur de transcription GATA-1 dont nous allons maintenant résumer les principales caractéristiques car c'est un des acteurs dont nous discuterons beaucoup dans ce travail de thèse.

1.3.2. GATA-1 et son rôle majeur dans la différenciation érythroïde terminale : survie, différenciation et maturation

GATA-1, aussi appelé Eryf-1, NF-E1, NF-1 et GF-1, est un facteur de transcription majeur de l'érythropoïèse et de la mégacaryopoïèse présent dans les cellules érythroïdes mais également dans les mégacaryocytes, les cellules mastocytaires, les éosinophiles (Ferreira, Mol. Cell Biol. 2005), et les cellules dendritiques. (Gobel, Blood 2009) II a été découvert à la fin des années 1980, comme un facteur régulateur des chaînes de globine. (Wall, Genes Dev. 1988; Evans, Proc. Natl. Acad. Sci USA 1988) (voir chapitre 2.4.4.2) **GATA-1 est indispensable à la différenciation et maturation érythroïde terminale mais aussi à la survie et l'expansion des proérythroblastes et érythroblastes basophiles** alors qu'un autre membre de la famille GATA, GATA-2, joue un rôle plus en amont dans la différenciation érythroïde précoce (figure 4).



Model for the dynamic regulation of GATA1 and GATA2 activity during erythropoiesis.

Figure 4 : Modulation dynamique de GATA-1 et 2 au cours de l'érythropoïèse. GATA-2 est exprimé dans les progéniteurs précoces. Lorsque GATA-1 est activé, l'expression de GATA-2 décline. Durant la différenciation érythroïde terminale, GATA-1 a une expression maximale au stade proérythroblaste qui décline ensuite, même si son expression reste présente, et indispensable à la maturation terminale.

GATA-1 joue son rôle de facteur de transcription en se fixant à une séquence d'ADN consensus 5' A/T GATA A/G, appelée motif GATA, dans le promoteur de nombreux gènes érythroïdes pour moduler leur expression, mais aussi en se fixant à des cofacteurs dont l'indispensable et bien nommé « Friend of GATA-1 » (FOG-1). (Kim, Oncogene 2007) GATA-1 est ainsi responsable de l'expression des gènes principaux nécessaires à cette différenciation comme l'Epo-R, la glycophorine A (GpA), les chaînes de globines (voir aussi chapitre 2.4.4.) et la protéine anti-apoptotique BcI-X_L (membre de la famille BcI-2). (Gregory, Blood 1999; Ferreira Mol. Cell Biol. 2005) Les cellules érythroïdes de souris déficientes pour GATA-1 (Weiss, Genes Dev. 1994 ; Pevny, Development 1995) ou des cellules souches embryonnaires (ES) invalidées pour le gène GATA-1 (Weiss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995) subissent *in vitro* un arrêt de différenciation au stade proérythroblaste et meurent par apoptose. (Weiss, Proc. Natl. Acad. Sci U S A 1995) Pour découpler l'arrêt de différenciation de

l'apoptose, la lignée G1E a été créée par insertion du gène Bcl2 dans les cellules ES GATA-1⁻ qui a permis leur survie sans rétablir leur différenciation. (Weiss, Mol. Cell. Biol. 1997) La délétion de GATA-1 chez la souris induit in vivo une létalité embryonnaire entre le 10,5 et 11,5^{ème} jour causée par une anémie sévère et un blocage au stade proérythroblaste. (Fujiwara, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996) GATA-1 permet donc la survie, la différenciation et la maturation des précurseurs érythroïdes et semble prévenir de l'apoptose. (Weiss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995) Le rôle supposé anti-apoptotique de GATA-1 au cours de la différenciation érythroïde terminale pose cependant question. En effet, l'étude de l'apoptose, dans ces expériences des années 1990, peut être critiquée car elle est basée sur des techniques anciennes et peu précises : aspect cytologique et technique de marguage par TUNEL, dont la spécificité pour l'étude de l'apoptose a été contestée. (Hristoskova, Clin. Chem. 2001 et 2003, Exp. Cell Res. 2007) Ces travaux ne comportaient pas d'étude d'expression d'Annexine-V, ni de statistiques précises d'augmentation d'apoptose. (Weiss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995) Dans une étude publiée dans Nature, datant de 1999, étudiant le rôle de GATA-1 dans la différenciation érythroïde terminale, De Maria et col. démontrent que le clivage de GATA-1 par la caspase-3 après stimulation des récepteurs de mort est à l'origine de l'arrêt de maturation des érythroblastes et altère leur survie à long terme (voir aussi chapitre 1.3.3). En effet, GATA-1 possède, chez l'homme, trois sites de clivage par les caspases : deux sites mineurs et un site majeur qui est clivé par les caspase-3, -7, -8, -9 et -10 ce qui aboutit à des fragments de 30 kDa et 16 kDa. (De Maria, Nature 1999) Les auteurs suggèrent un rôle anti-apoptotique de GATA-1 uniquement sur la baisse de la prolifération cellulaire et sur l'augmentation de cellules mortes comptées au microscope optique par coloration au bleu trypan dans des érythroblastes cultivés in vitro, n'exprimant plus GATA-1. (De Maria, Nature 1999) (aucune étude de l'Annexine-V ou TUNEL dans cet article). Si le clivage de GATA-1 par la caspase-3 est bien établi, la fonction anti-apoptotique de GATA-1 est donc, comme nous l'avons vu, mal étayée. Cette hypothèse s'est construite en spéculant que GATA-1 pourrait jouer un rôle anti-apoptotique en régulant positivement l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L (De Maria, Nature 1999). Si le rôle de GATA-1 sur l'expression de cette protéine paraît bien établi (Gregory, Blood 1999), aucune étude n'a encore prouvé que le rôle anti-apoptotique présumé de GATA-1 résultait de l'induction de ce gène. L'effet de GATA-1 sur la survie et la

prolifération cellulaire pourrait résulter d'une action sur le cycle cellulaire et non d'un mécanisme anti-apoptotique. (Rylski, Mol Cell Biol 2003) En effet GATA-1 induit des modifications d'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Il active notamment directement la transcription du gène p21 qui inhibe les cyclines dépendant des kinases (Papetti, Cell Cycle 2010), augmente l'expression du gène *CDC6*, régulateur de la phase S (Fernández-Morales, Cell Cycle 2012)... En fait, il semble que GATA-1 pourrait agir comme un activateur ou répresseur du cycle cellulaire selon son expression, le moment de la différenciation et peut être selon le micro-environnement cellulaire. (Rylski, Mol. Cell Biol. 2003) On ne peut exclure aussi que GATA-1 puisse avoir un rôle anti-apoptotique uniquement dans certaines phases de la différenciation terminale (aux stades précoces notamment).

Bien que la plupart des souris exprimant faiblement GATA-1 meurent d'une différenciation érythroïde inefficace, quelques-unes naissent et survivent jusqu'à l'âge adulte. L'analyse de ces différents types de souris montre une relation directe entre le niveau d'expression de GATA-1 et la maturation érythroïde. (McDevitt, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997) Enfin, la régulation de l'expression de GATA-1 doit être fine car on a vu que l'hypoexpression va affecter la maturation érythroïde et provoquer l'arrêt de prolifération mais l'hyperexpression est aussi délétère, aboutissant, chez la souris, à la mortalité embryonnaire et à une anémie par inhibition de la différenciation terminale. (Whyatt, Nature 2000) Cette inhibition de la différenciation érythroïde terminale par l'hyperexpression de GATA-1 a aussi été démontrée *in vitro* dans des cellules érythroleucémiques murines. (Whyatt, Genes Funct. 1997)

En dehors du clivage de GATA-1 par la caspase 3, d'autres mécanismes de dégradation de GATA-1 sont aussi impliqués et certainement pas tous connus. Il a été par exemple montré récemment, dans le laboratoire, qu'Hsp27 jouait un rôle de dégradation de GATA-1 par le protéasome. (De Tonnel, Blood 2010)

Nous n'aborderons pas dans cette introduction la régulation propre de l'expression génique de GATA-1 dont le gène se situe sur le chromosome X et de la commutation (« switch » en Anglais) entre GATA-2 et GATA-1, qui dépasse le sujet de la thèse. De plus, cette régulation est très complexe car de nombreux facteurs de transcription interviennent comprenant, entre autres, des hormones (oestrogènes) et les produits GATA-1 et GATA-2 eux-mêmes. (Revue dans Kaneko H Curr. Opin. Hematol. 2010)

1.3.3. Régulation de l'érythropoïèse physiologique par les caspases

1.3.3.1. Rôle différentiant des caspases au cours de l'érythropoïèse

Il existe deux voies majeures d'activation des caspases :

(1) la voie des récepteurs membranaires de mort (voie extrinsèque) qui va activer la caspase-8;

(2) la voie mitochondriale (voie intrinsèque), liée à la dépolarisation de la mitochondrie par divers stimulus intra-cytoplasmiques, qui aboutit à la formation de l'apoptosome, qui comprend des molécules relarguées lors de la dépolarisation de la mitochondrie : le cytochrome *c*, Apaf-1 et la pro-caspase-9. L'apoptosome, cytoplasmique, active la pro-caspase-9.

Les caspases-8 (voie extrinsèque) et -9 (voie intrinsèque) activées ont pour cible finale commune la caspase-3, qui est, dans sa forme active, la caspase exécutrice la plus importante car elle clive la majorité des substrats. (Porter, Cell Death Differ. 1999)

Les caspases sont les actrices bien connues du mécanisme de mort cellulaire, appelée apoptose. Cependant, elles peuvent avoir, comme on va le souligner une action de différenciation/maturation cellulaire.

Il est bien établi depuis la fin des années 1990 que de nombreuses protéines de la voie des caspases sont augmentées dans les érythroblastes. (Gregoli, J. Cell Physiol. 1999) Dans le laboratoire, il a été démontré qu'il existait une dépolarisation de la membrane mitochondriale lors de la transition stade basophile/polychromatophile avec activation de la caspase -9, -7 et -3. (Zermati, J. Exp. Med. 2001; Hristoskova, Exp. Cell Res., 2007) De plus, l'inhibition des caspases par le z-VAD (Zermati, J. Exp. Med. 2001), ou par ARN interférence (siRNA) spécifique de la caspase-3 (Carlile, Blood 2004), entraîne l'arrêt de maturation des progéniteurs érythroïdes au stade basophile chez l'homme (Zermati, J. Exp. Med. 2001; Carlile, Blood 2004) et chez la souris. (Kolbus, J. Exp. Med. 2002) L'activation des caspases semble être associée aux changements morphologiques observés au cours de la maturation terminale qui ressemblent à ceux d'un processus apoptotique. En effet, l'activation de la caspase-3 provoque le clivage de la **Lamine B**. (Zermati, J. Exp. Med. 2001 ; Morioka, Exp. Cell Res. 1998) Ce clivage de Lamine B pourrait induire la condensation nucléaire comme cela a été montré au cours de l'apoptose dans d'autres modèles cellulaires. (Broerls, Eur. J. Cell Biol. 2002) Par ailleurs, la protéine **Acinus**, qui permet la condensation de la chromatine (mais pas la fragmentation du DNA) lors de l'apoptose (Sahara, Nature 1999), est aussi clivée par la caspase-3 activée au cours de l'érythropoïèse. (Zermati, J. Exp. Med 2001) Ce clivage est nécessaire à l'activité d'Acinus dans d'autres modèles cellulaires. On peut donc là aussi spéculer que le clivage d'Acinus puisse aussi participer à la condensation de la chromatine au cours de la différenciation érythroïde. Il a enfin été démontré dans notre laboratoire que la kinase Rock-1 activée principalement par le SCF était impliquée dans la différenciation terminale en intervenant au niveau des remaniements du cytosquelette. Son clivage par la caspase-3 lui permet de maintenir son activation dans les érythroblastes les plus matures qui ont perdu l'expression du récepteur c-kit. (Gabet, Cell Death Differ. 2011)

La présence d'autres molécules cytoplasmiques impliquées dans l'apoptose a aussi été identifiée au cours de la différenciation érythroïde chez l'homme, notamment Apaf-1, AIF et le cytochrome *c*. (Hristoskova, Exp. Cell Res. 2007) Le rôle et la régulation de ces protéines pro-apoptotiques n'ont pas encore été correctement étudiés à ce jour dans la différenciation érythroïde.

Il y a donc clairement au cours de l'érythropoïèse physiologique une activation transitoire des caspases par la voie mitochondriale (Zermati, J. Exp. Med 2001) qui participent à la différenciation érythroïde sans induction d'apoptose. (Rubiolo, Blood 2006 ; De Maria, Nature 1999). Si l'implication des récepteurs de mort dans la régulation négative de l'érythropoïèse est bien établie (De Maria, Nature 1999; Koulnis, PloS ONE 2011), son rôle dans la régulation positive est moins clair. Les travaux de Carlile et col. suggèrent que la voie Fas/FasL pourrait intervenir dans la maturation des progéniteurs érythroïdes précoces. (Carlile, FEBS Lett 2009)

Les mécanismes précis de l'activation des caspases au cours de l'érythropoïèse, particulièrement les stimulus provoquant la dépolarisation de la mitochondrie, ne sont pas connus à ce jour, de même que beaucoup de protéines cibles de l'activation transitoire de ces caspases dans les érythroblastes.

25
1.3.3.2. Apoptose et mécanismes de protection de l'apoptose au cours de l'érythropoïèse

Les preuves de l'absence d'apoptose chez l'homme, au cours de l'érythropoïèse, dans des conditions physiologiques avec dose optimale d'Epo, sont, en dehors de l'aspect morphologique caractéristique des cellules :

- une expression membranaire faible des phosphatidylsérines (marqueur d'apoptose) sur des érythroblastes humains cultivés *in vitro* (Zermati, J. Exp. Med 2001 ; Ribeil, Nature 2007 ; Hristoskova, Exp. Cell Res. 2007) ou sur des érythroblastes fœtaux, présents dans la circulation maternelle lors de la gestation, alors même que ces érythroblastes expriment le marquage TUNEL (marqueur mettant en évidence des fragments d'ADN, utilisé comme marqueur d'apoptose, mais possiblement pris en défaut au cours de la différenciation érythroïde). (Hristoskova, Clin. Chem. 2003)
- l'absence de translocation d'AIF dans le noyau dans des lignées érythroïdes humaines TF-1 (Lui, FEBS Lett. 2007) et
- l'absence du clivage d'ICAD, Inhibitor of Caspase Activated DNase, en CAD (Caspase Activated DNase, nucléase responsable du clivage du DNA). (Lui, FEBS Lett. 2006) Cela pourrait expliquer l'absence de fragmentation de l'ADN dans des lignées érythroïdes TF-1. (Lui, FEBS Lett. 2006)

Cette absence d'apoptose est doublement paradoxale car il y a bien, comme nous l'avons écrit, en présence d'Epo, une activation des caspases exécutrices au cours de la différenciation érythroïde, mais aussi car GATA-1, facteur de transcription nécessaire à la survie et à la différenciation cellulaire érythroïde, n'est pas dégradé en présence d'Epo, alors même que GATA-1 présente, chez l'homme, un site de clivage pour la caspase-3 activée. Cela devrait donc aboutir à sa dégradation et l'arrêt de la maturation et de la prolifération cellulaire. (De Maria, Nature 1999)

1.3.4. Induction et prévention de l'apoptose dans les cellules érythroïdes : rôle physiologique de Fas/Fas-ligand et d'Hsp70

L'apoptose et l'inhibition de la maturation cellulaire sont des mécanismes très utiles pour réguler la production aussi énorme que celle de l'érythropoïèse. Ce sont d'ailleurs les mécanismes par lesquels l'Epo module la synthèse de la lignée rouge. Lors de la déprivation des cellules en Epo l'apoptose augmente et la maturation érythroïde ralentit (régulation négative de l'érythropoïèse). En cas d'anémie ou d'hypoxie, l'augmentation rapide de synthèse d'Epo par le rein va, au contraire, favoriser l'inhibition des phénomènes d'apoptose et de maturation. Inversement, en cas de carence en Epo, l'arrêt de maturation et d'apoptose érythroïde vont s'enclencher pour limiter très rapidement la production d'érythrocytes.

Nous allons voir maintenant l'explication moléculaire de cette régulation de l'apoptose, intimement liée à celle de la différenciation/maturation, au cours de l'érythropoïèse. Deux mécanismes non exclusifs concourent, selon les connaissances actuelles, à la régulation de la prolifération cellulaire et de la maturation érythroïde. Le socle commun de ces deux mécanismes est la protection ou destruction de GATA-1.

1. **L'activation de la voie Fas/Fas-Ligand** (De Maria, Nature 1999) qui va aboutir à la destruction de GATA-1 et à la mort de précurseurs immatures ;

2. La protection ou non de GATA-1 du clivage par la caspase-3 selon la localisation nucléaire d'Hsp70. (Ribeil, Nature 2007)

1.3.4.1. Fas/Fas-ligand dans la différenciation érythroïde

Fas appartient aux récepteurs membranaires de mort cellulaire de la voie extrinsèque de l'apoptose. Les récepteurs de mort les mieux caractérisés sont, en dehors de Fas (ou CD95) activé par son ligand FasL, le récepteur TNF-R1 qui lie le TNF- α , TRAIL-R1 (DR4) et TRAIL-R2 (DR-5), qui sont les récepteurs de TRAIL (TNF-related apoptosis induced ligand), et DR3 dont le ligand est Apo3L. (Peter,

Curr. Opin. Immunol.1998) Les érythroblastes immatures expriment Fas, TNF-R1, TRAIL-R1, TRAIL-R2. (De Maria, Nature 1999) L'expression de Fas est faible dans les progéniteurs érythroïdes plus immatures (Dai, Blood 1998) et augmente dès les phases précoces de l'érythropoïèse entre le stade CFU-E et le stade proérythroblaste. (De Maria, Nature 1999) Inversement, l'expression membranaire de Fas-L augmente tardivement au cours de l'érythropoïèse (De Maria, Nature 1999; De Maria, Blood 1999), de même que l'expression de TRAIL (Zamai, Blood 2000 ; De Maria, Nature 1999), à partir du stade polychromatophile et peut donc induire, par contact cellulaire, l'apoptose et l'arrêt de maturation des précurseurs plus immatures, au stade d'érythroblaste basophile, qui expriment fortement le récepteur Fas. (De Maria, Blood. 1999) L'intéraction de Fas/Fas-L déclenche alors l'activation des caspases par la voie extrinsèque dans les précurseurs immatures. La caspase-3 activée va cliver GATA-1, entraînant ainsi l'apoptose, l'arrêt de prolifération et l'arrêt de maturation des érythroblastes immatures, selon la concentration d'Epo. En effet, en présence de faible concentration en Epo, Fas-L est très exprimé ce qui induit l'arrêt de maturation des érythroblastes basophiles et une apoptose élevée de ces précurseurs immatures alors qu'en présence de forte concentration d'Epo, Fas-L est peu exprimé sur les polychromatophiles ce qui induit peu d'apoptose des érythroblastes immatures. (De Maria, Nature 1999, Blood 1999) In vitro, des concentrations élevées d'Epo protègent aussi de la mort induite par l'activation de Fas. (De Maria, Blood 1999) Par ailleurs, la même équipe a montré dans des cultures in vitro humaines, qu'un autre facteur de transcription, SCL/Tal-1, était détruit très précocement lors de la différenciation érythroïde terminale par l'activation des caspases après stimulation de la voie Fas/Fas-L et que la transduction d'une forme non clivable de SCL/Tal-1 protégeait GATA-1 du clivage des caspases et restaurait une différenciation et prolifération érythroïde malgré de faibles concentrations en Epo. (Zeuner, Cell Death Differ. 2003) Nous avons cependant déjà émis des doutes sur l'étude de l'apoptose dans ces travaux (cf chapitre 1.3.2.), ce qui ne retire rien au mécanisme de régulation par cette voie Fas/Fas-L même si elle ne passe peut-être pas par une augmentation d'apoptose mais seulement par un arrêt du cycle cellulaire et un arrêt de différenciation induit par la dégradation de GATA-1. Cette régulation négative de l'érythropoïèse par la voie Fas/Fas-L a été également démontrée chez la souris. (Koulnis, PLoS ONE 2011)

1.3.4.2. Rôle d'Hsp70 dans l'érythropoïèse physiologique

1.3.4.2.1. Protection de GATA-1 et autres facteurs

Nous avons vu qu'un point énigmatique qui restait à expliquer, au cours de la différenciation érythroïde terminale, était l'absence de clivage de GATA-1 par la caspase-3 activée, en présence de concentration optimale d'Epo, et l'absence de mise en évidence de marqueurs d'apoptose sur des précurseurs érythroïdes tardifs. Ce paradoxe a été expliqué, au moins en partie, par le travail de thèse de Jean-Antoine Ribeil, dans le laboratoire, qui a montré qu'Hsp70 était la pièce manquante du puzzle. En effet, en présence d'Epo, Hsp70 se concentre dans le noyau, au cours de la différenciation érythroïde, pour protéger GATA-1 du clivage par la caspase-3 activée physiologiquement. (Ribeil, Nature 2007; Frisan, Blood 2012) Hsp70 colocalise avec GATA-1 dans le noyau des érythroblastes et intéragit avec GATA-1 directement par sa partie SBD, comme l'ont montré des expériences d'immunoprécipitation avec des mutants d'Hsp70 n'exprimant que l'un ou l'autre des deux domaines d'Hsp70. (Ribeil, Nature 2007) Ceci a été démontré in vitro dans un modèle de différenciation érythroïde en deux phases à partir de cellules humaines (cellules de sang de cordon mais aussi cellules souches adultes provenant de moelles osseuses de donneurs sains ou cellules souches circulantes après stimulation par G-CSF). C'est le même modèle de culture que nous avons utilisé dans cette thèse. En l'absence d'Epo, Hsp70 est délocalisé du noyau vers le cytoplasme et GATA-1 est alors clivé ce qui aboutit à une baisse de prolifération, un arrêt de différenciation/maturation. Un excès d'apoptose est aussi observé. L'inhibition de l'expression d'Hsp70 par siRNA induit aussi le clivage de GATA-1, l'apoptose et arrêt de maturation des érythroblastes. La transduction d'un mutant de GATA-1 (µGATA-1) non clivable par la caspase-3 réverse le phénotype induit par de faibles concentrations d'Epo. (Ribeil, Nature 2007) La présence d'Hsp70 et sa colocalisation avec GATA-1 a été également démontrée in vivo dans des érythroblastes issus de la moelle humaine. (Ribeil, Nature 2007) Le mécanisme putatif de la protection de l'apoptose dans ce modèle passerait par le mécanisme suivant : Hsp70 en protégeant GATA-1 permettrait son rôle de facteur de transcription de la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L. Cependant, cette hypothèse n'a pas été parfaitement démontrée : l'expression de Bcl-X_L baisse quand on inhibe l'expression d'Hsp70 par siRNA (Ribeil, Nature 2007), mais cela pourrait aussi passer par une action protectrice cytoplasmique directe ou indirecte d'Hsp70 sur Bcl-X_L, sans lien avec GATA-1. Il a été montré récemment dans un modèle d'érythropoïèse pathologique, la myélodysplasie de bas grade, que GATA-1 était clivé du fait d'un défaut de localisation nucléaire d'Hsp70. Dans cette pathologie, l'expression de Bcl-XL n'était cependant pas modifiée dans ces cellules alors même que l'expression cytoplasmique d'Hsp70 était augmentée et GATA-1 absent. (Frisan, Blood 2012) L'effet anti-apoptotique d'Hsp70 pourrait donc aussi passer par d'autre voies, en se liant à d'autres protéines soit cytoplasmiques, soit nucléaires. Il a été ainsi montré dans un modèle de différenciation érythroïde in vitro avec les lignées érythroleucémiques humaines TF-1 que l'Epo induisait une dépolarisation mitochondriale. De façon concomitante, Hsp70 était surexprimée dans le cytoplasme et se liait à un facteur mitochondrial libéré lors de la dépolarisation de la mitochondrie, l'AIF (apoptosis-inducing factor) empêchant de jouer son rôle destructeur de DNA dans le noyau, et permet ainsi une différenciation érythroblastique normale. (Lui, FEBS Lett. 2007) Il est à noter que, dans ce modèle de culture de lignée cellulaire, Hsp70 n'était pas ou peu exprimée dans le noyau.

La protection de GATA-1 par Hsp70 nucléaire est donc un autre mécanisme de régulation de la production érythroïde qui se place probablement à un niveau plus tardif de la différenciation (après l'activation physiologique des caspases) par rapport au système Fas/Fas-L qui contrôle les précurseurs très précoces (proérythroblastes et basophiles).

1.3.4.2.2. Régulation de la localisation cyto-nucléaire d'Hsp70

Le(s) mécanisme(s) d'entrée et de sortie d'Hsp70 du noyau n'est (ne sont) pas totalement élucidé(s). La sortie nucléaire d'Hsp70 est un phénomène actif. En effet, le blocage de molécules d'export nucléaire par la leptomycine B permet de maintenir Hsp70 dans le noyau de cellules déprivées en Epo. Il a été montré que la phosphorylation d'Hsp70 sur la sérine 400 (S400), était impliquée dans l'export nucléaire d'Hsp70 (travail de thèse du laboratoire de Julie Vandekerckhove, non encore publié). Cette particularité nous a permis de transduire dans ce travail les

érythroblastes par infection lentivirale avec un mutant d'Hsp70 dans lequel ce résidu S400 est muté en alanine, non phosphorylable (Hsp70-S400A), et ayant donc la particularité de « forcer » l'expression nucléaire d'Hsp70 en empêchant sa sortie active du noyau. Il a été élaboré par Emilie Frisan du laboratoire du Pr Michaëla Fontenay (Hôpital Cochin). (Frisan, Blood 2012)

Le mécanisme précis de l'entrée d'Hsp70 dans le noyau n'est par contre pas connu. Une protéine d'import nucléaire d'Hsp70, ne faisant pas partie de la famille des importines, vient d'être découverte, nommée Hikeshi. (Kose, Cell 2012) II serait intéressant de l'étudier au cours de l'érythropoïèse.

Ces divers travaux de notre laboratoire ont aussi pointé une particularité de l'expression d'Hsp70, qui comme on l'a vu dans le chapitre 1.2.1., est normalement inductible dans toutes les cellules humaines mais exceptionnellement présente à d'aussi fortes concentrations à l'état physiologique dans les érythroblastes.

1.4. Hsp70 au cours de l'érythropoïèse pathologique

1.4.1. Excès de sortie nucléaire: la myélodysplasie

Un des modèles d'érythropoïèse pathologique où il semblait important d'étudier le rôle d'Hsp70 est la dysmyélopoïèse. En effet, cette pathologie est caractérisée par une augmentation importante de l'apoptose des érythroblastes et un défaut de maturation cellulaire. (Frisan, Blood 2012) II a été démontré, en collaboration entre notre laboratoire et celui du Pr Michaëla Fontenay à l'institut Cochin, qu'Hsp70 était surexprimée au cours des myélodysplasies de bas grade, mais que sa concentration nucléaire dans les érythroblastes diminuait avec la différenciation au lieu d'augmenter. Il en résultait le clivage de GATA-1. La cause de cette absence de concentration d'Hsp70 dans le noyau alors que la quantité globale d'Hsp70 cytoplasmique était augmentée n'est pas totalement élucidée. Les travaux de thèse de Julie Vandekerckhove, dans le laboratoire, ont montré que le SCF induit l'export nucléaire d'Hsp70 par la voie Pi3K/AKT, alors que l'Epo inhibe cet export (travaux déjà évoqués, non encore publiés). Notre hypothèse est qu'il pourrait exister dans les myélodysplasies un excès d'export, possiblement lié à un maintien anormal de l'expression du récepteur c-kit tardivement dans ces érythroblastes (Fontenay,

résultats non publiés). On ne peut cependant pas totalement éliminer un problème dans l'import nucléaire. Étonnamment, dans ce modèle, la restauration de la localisation nucléaire d'Hsp70 grâce au mutant Hsp-S400A constitutivement nucléaire ou la transduction des érythroblastes par un mutant non clivable de GATA-1 (µGATA-1) améliore la maturation des cellules (ce qui était attendu) mais ne permet pas de restaurer l'apoptose. (Frisan, Blood 2012)

Cet exemple pathologique démontre, tout comme ce qui avait été mis en évidence en physiologie par JA Ribeil, que c'est avant tout la localisation cyto/nucléaire qui est importante au cours de l'érythropoïèse.

1.4.2. Défaut d'entrée nucléaire : la β-thalassémie majeure

Nous allons voir dans cette thèse un autre modèle de Hsp «pathie » lié à un défaut d'entrée, la β -thalassémie. Nous avons posé comme hypothèse de travail que l'excès de chaînes d' α -globine libres, dont la synthèse augmente exponentiellement au stade d'érythroblaste polychromatophile, pouvait séquestrer Hsp70 dans le cytoplasme et ainsi l'empêcher d'entrer dans le noyau afin de jouer son rôle protecteur de GATA-1. Cela pourrait expliquer l'excès de mort par apoptose et un arrêt de maturation à ce stade de différenciation, définissant l'érythropoïèse inefficace.

1.4.3. Rôle d'Hsp70 et d'une co-chaperonne d'Hsp70, Bag-1, au cours de l'anémie de Blackfan-Diamond.

Bag-1 est impliquée dans la libération d'Hsp70 de son substrat. Il a été très récemment démontré que l'expression de cette protéine était diminuée dans les érythroblastes de patients atteints d'anémie de Blackfan-Diamond, érythroblastopénie congénitale caractérisée par un défaut de biosynthèse ribosomale ayant pour conséquence une baisse de synthèse de certaines protéines (mutations des gènes de la famille RPS, notamment RPS19). L'inhibition Bag-1 par shRNA ne modifie pas la prolifération cellulaire d'érythroblastes murins en culture, mais diminue la différenciation érythroïde. Enfin, les souris déficientes en **Bag-1**^{-/-} meurent d'un défaut de développement cérébral et d'une anémie à J13,5 embryonnaire. Ces souris présentent une baisse des précurseurs érythroïdes fœtaux hépatiques et un

déficit de différenciation érythroïde terminale. (Horos, Blood 2012) Le lien entre le défaut de Bag-1 et Hsp70 n'a pas été étudié dans ces expériences. Nous pouvons poser l'hypothèse, à la lumière de ces données récentes, que la « mobilité » intracellulaire Hsp70 soit perturbée par la diminution de Bag-1, car celle-ci devrait logiquement perturber la libération des substrats et par conséquent séquestrer Hsp70 dans certains sous-compartiments cellulaires, ce qui pourrait la détourner de son rôle protecteur nucléaire de GATA-1. On peut aussi envisager que le déficit en Bag-1 conduise à une élimination précoce d'Hsp70, lié irréversiblement à des protéines mal formées, par le protéasome. En effet, nous avons pu observer dans cette maladie, dans des expériences préliminaires, un déficit d'expression d'Hsp70 dans les érythroblastes en cultures. Enfin, ce défaut d'expression pourrait aussi être dû à un défaut de synthèse d'Hsp70 secondaire à l'anomalie ribosomale. Des études sont en cours pour préciser le rôle d'Hsp70 dans cette maladie (Lydie Da Costa).

1.5. Résumé de la régulation de l'érythropoïèse terminale humaine

Il est bien démontré que GATA-1 est le facteur permettant la **prolifération**, la **survie** et la **différenciation** des stades précoces de l'érythropoïèse terminale (proérythroblaste et basophile) et la **survie** et la **maturation** des stades plus tardifs. En cas d'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose (Fas-Fas-L) dans les cellules immatures (proérythroblastes, basophile 1), la caspase-3 activée par cette voie lors de certaines conditions (diminution de la concentration en Epo notamment) va cliver GATA-1, peu protégé à ces stades par Hsp70 (car Hsp70 se concentre dans le noyau des cellules plus matures, son expression nucléaire augmente avec la différenciation). Cela entraîne l'arrêt de prolifération et de différenciation. L'existence d'une véritable mort par apoptose de ces cellules érythroïdes à ces stades précoces reste à être démontrée, comme nous l'avons déjà écrit, avec plus de précision. Cette voie semble être déclenchée **avant** l'activation « physiologique » des caspases qui se situe entre le basophile et le polychromatophile.

Un autre mécanisme, plus tardif, va donc être nécessaire pour protéger les cellules de l'activation physiologique des caspases. C'est la concentration nucléaire d'Hsp70 qui va alors protéger GATA-1 de la caspase-3 activée et permettre alors la survie et surtout une différenciation et une maturation cellulaire optimale. La protection de l'apoptose, qui devrait découler de l'activation physiologique des caspases, est plus compliquée. Elle pourrait être liée directement à l'expression de GATA-1, protégé par

Hsp70, qui permettrait l'expression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-X_L. Ce rôle anti-apoptotique de GATA-1 passant par Bcl-X_L n'a cependant, comme nous l'avons vu, pas été démontré. Hsp70 pourrait aussi avoir un rôle direct en inhibant diverses protéines anti-apoptotiques cytoplasmiques ou nucléaires comme cela a été montré dans d'autres modèles cellulaires (notamment cellules cancéreuses).

2. Synthèse de l'hémoglobine, ontogénie de l'hémoglobine

2.1. Intérêt de l'hémoglobine dans les globules rouges

L'hémoglobine est une petite protéine (64,4 kDa) dont le rôle principal est le transport de l'oxygène au sein des globules rouges (GR). Dans les conditions normales, chez l'homme, chaque GR (l'organisme en fabrique 200 milliards par jour) contient 300 millions de molécules d'hémoglobine (concentration de 32%). A cette concentration, si l'hémoglobine était diluée dans le plasma, cela provoquerait une hyperosmolarité tellement élevée (350 g d'hémoglobine/L !) que l'oxygénation normale aux tissus ne pourrait correctement se faire et des phénomènes de thrombose surviendraient. Le GR est donc devenu le mode de transport de l'oxygène chez tous les vertébrés, à l'exception de certains poissons (*Channichthyidae*), vivant dans des eaux froides et riches en oxygène, qui transportent l'oxygène dissout dans le sang. (Ruud, Nature 1954)

Chez les mammifères, la disparition du noyau (et donc de l'ADN) et de l'ARN des GR matures ont amélioré la déformabilité cellulaire rendue nécessaire par la petite taille des capillaires. Elle a permis aussi aux GR d'adopter leur forme biconcave, caractéristique qui augmente les surfaces de contact et d'échanges avec l'endothélium. Enfin les GR de mammifères ne contiennent plus de mitochondries et ne peuvent donc plus consommer l'oxygène qu'ils transportent. Les GR d'oiseaux et de la plupart des reptiles ont conservé noyau, ADN et ARN.

2.2. Structure générale de l'hémoglobine

Chaque molécule d'hémoglobine est un tétramère constitué de 4 chaînes polypeptidiques (chaînes de globine), identiques deux à deux, qui intéragissent dans l'espace pour former une structure quaternaire. Les acides aminés hydrophobes sont protégés à l'intérieur de la structure globulaire alors que les motifs hydrophiles sont à la surface de la molécule. Chaque chaîne de globine contient une molécule, appelée protoporphyrine IX, associée à un atome de fer. Le dérivé ferreux (Fe²⁺) de la protoporphyrine IX constitue **l'hème** qui, maintenu dans l'hémoglobine sous sa forme réduite (Fe²⁺) grâce à la methionine réductase, permet de lier l'oxygène de façon réversible. Lorsque les mécanismes de réduction sont débordés, il y a une apparition de dérivé ferrique (Fe³⁺), oxydé, de la protoporphyrine IX, qui constitue l'hémine/hématine (Fe³⁺). (Schechter, Blood 2008)

Une hémoglobine oxydée contenant de l'hème Fe³⁺ s'appelle méthémoglobine et ne peut plus libérer correctement l'oxygène aux tissus. Cette méthémoglobine sera ensuite dénaturée en hémichromes (cf infra). Cette forme méthémoglobine ne représente qu' 1 à 2% de l'hémoglobine totale. Parmi les facteurs importants de la réduction, la méthémoglobine reductase est responsable de la conversion de la méthémoglobine en oxyhémoglobine. Des toxiques (médicaments...) peuvent affecter cette enzyme et provoquer une méthémoglobinémie parfois mortelle du fait d'une mauvaise oxygénation tissulaire (patients bleus, cyanosés).

La tridimensionnelle structure de l'hémoglobine a été pour la première fois identifiée en 1960 par cristallographie aux rayons X par Max Perutz (Perutz, Nature 1960), très peu de temps après celle de la myoglobine par John Kendrew. (Kendrew, 1962, Nature 1958) En ces deux biochimistes Anglais recevaient conjointement le prix Nobel de chimie pour



leurs études des structures des protéines globulaires. Myoglobine et hémoglobine

sont donc les premières protéines dont on a caractérisé la structure spatiale. Cela a consacré les chaînes de globine comme un modèle d'étude de la structure quaternaire des protéines en biochimie depuis presque 50 ans. Leur structure protéique sert de modèle dans l'enseignement secondaire, et bien sûr dans l'enseignement supérieur. Ce fut ensuite et c'est toujours un modèle en génétique d'étude de la modulation de l'expression des gènes (inhibition ou expression) des différentes chaînes de globine et les maladies génétiques touchant ces gènes, appelées hémoglobinopathies...



Figure 5 : Structure spatiale de l'hémoglobine : *en bleu : chaînes* α *, en rouge chaînes* β *, en vert hème (source Wikipedia)*

2.3. Différents types d'hémoglobine humaine

Excepté dans les toutes premières semaines de l'embryogenèse (où des chaînes zeta sont produites), deux de ces chaînes sont obligatoirement les chaînes d'aglobine. Elles s'associent à 2 autres chaînes dites « non- α » suivant l'âge de développement de l'être humain. Ainsi, le type d'hémoglobine prédominant chez l'homme sain dès l'âge de 6 mois après la naissance, est appelé hémoglobine adulte (HbA) (98%). Celle-ci est formée de 2 chaînes α et de 2 chaînes β ($\alpha_2\beta_2$ HbA); par ailleurs un type mineur (2%) est formé de 2 chaînes α et 2 δ ($\alpha_2\delta_2$ HbA2). L'hémoglobine fœtale ($\alpha_2\gamma_2$ HbF) est essentiellement concentrée dans un sous-type d'érythrocytes appelés cellules F. (Boyer, Science 1975) La concentration en HbF représente chez l'adulte sain moins de 1% (médiane autour de 0,4% chez des adultes sains Anglais). (Zago, Blood 1979) (tableau 1 et figure 7) Les cellules F, dérivant des réticulocytes F, représentent 1 à 7% des globules rouges totaux d'un individu après 1 an (variable selon les individus mais stable, génétiquement déterminé, au cours de la vie, pour un même individu). Chaque cellule F contient une quantité importante d'HbF mais co-exprime aussi une proportion variable d'HbA. La distribution d'HbF est très hétérogène au sein de ces cellules F, ce qui explique le pourcentage plus important de cellules par rapport au pourcentage global d'HbF. (Maier-Redelsperger, Hématologie 1996; Merghoub, Blood 1996) Une augmentation d'HbF que l'on observe dans certaines conditions pathologiques dont la β-thalassémie peut donc être due à une augmentation du nombre de cellules F et/ou de la concentration en HbF par cellules F. C'est ce que l'on observe aussi lors d'une expansion érythroïde aiguë induite par des injections Epo (équivalent d'érythropoïèse de stress chez l'animal). (Blau, Blood 1993) La stimulation chronique d'Epo n'induit par contre pas d'augmentation d'HbF. Dans ces hémoglobinopathies majeures (drépanocytose, β-thalassémie), où existe une composante hémolytique, le taux d'HbF dépend également d'un troisième facteur de survie sélective des cellules F par rapport aux cellules non-F. (Maier-Redelsperger, Hématologie 1996)

Tableau 1.	Hémoglobine	adulte : pou	rcentage res	pectif des	différents	types
	5					

Hémoglobine	Composition en chaînes de globine	Concentration chez l'adulte*
HbA	$\alpha_2\beta_2$	96-98%
HbA2	$\alpha_2\delta_2$	2.3-3.5%
HbF	α _{2γ2}	<1%

*Cette concentration « adulte » est habituellement atteinte à l'âge 6-8 mois

2.4. Les chaînes de globine : ontogénèse, régulation génique des chaînes

2.4.1. Différents types de chaînes de globine

Les différentes chaînes de globine dérivent toutes d'une même chaîne ancestrale commune, divergeant il y a environ 500 millions d'années entre α et β . Elles ont, de ce fait, des homologies de séquence très importante entre elles (par exemple environ 50% d'homologie sur les acides aminés entre les chaînes α et β) (figure 6) (Wajcman, EMC Hématologie 2005 ; Schechter, Blood 2008). Elles sont dénommées par les lettres de l'alphabet grec : chaînes alpha- α , beta- β , gamma- γ , delta- δ , zeta- ζ , et epsilon- ϵ . Chaque chaîne est composée d'environ 140 acides aminés (142 exactement pour la chaîne α) connectés entre eux par des ponts peptidiques.



<u>Figure 6</u>: Généalogie, structure et localisation chromosomique des gènes de globine chez l'homme. *NGB, neuroglobine; CYGB, cytoglobine; MB, myoglobine* (D'après AN Schechter Blood 2008 et Peschle et al EMBO Rep. 2002;3:1146-1151

2.4.2. Ontogénèse de l'hémoglobine et régulation des gènes de la globine

Pendant la vie fœtale, l'hémoglobine dite "fœtale" est essentiellement composée de 2 chaînes α et 2 chaînes γ ($\alpha_{2\gamma_{2}}$ HbF). Elle a une affinité plus importante pour l'oxygène ce qui permet d'extraire plus efficacement l'oxygène du sang maternel. Dans les 6-7 premières semaines après la conception, l'embryon contient d'autres types de chaînes composant l'hémoglobine embryonnaire ($\alpha_{2,*}\epsilon_{2}$). La transition de l'hémoglobine embryonnaire à l'hémoglobine fœtale et de l'HbF à l'hémoglobine adulte (HbA) (réalisée dans les 6 premiers mois après la naissance chez l'homme) s'appelle **ontogénèse de l'hémoglobine, ou « switch » de l'hémoglobine.** (Figure 7)

Cette commutation d'expression des différentes chaînes de globine est due à l'activation séquentielle puis à la désactivation des différents gènes " β -like" situés sur le chromosome 11.

En effet, les gènes des chaînes de globine sont portés par deux chromosomes: 16 et 11. Les gènes de type α (2 gènes α -globine, α 1 et α 2, et 2 gènes zeta, ζ) sont sur le chromosome 16; les gènes dit " β -like", sur le chromosome 11. Les gènes " β -like" sont organisés de 5' en 3' sur l'ADN selon leur ordre d'expression au cours du développement : gène ϵ embryonnaire, ^G γ et ^A γ fœtaux, δ (minoritaire) et β adultes (= ϵ -^G γ -^A γ - δ - β , 2 gènes γ).





2.4.3. Régulation des gènes de globine : LCR et HS40

En amont du locus β -globine, sur le chromosome 11, cinq sites hypersensibles à la DNase1 (HS5 \rightarrow 1, numérotés de 5' en 3') constituent une région régulant l'expression des chaînes de type β appelée **LCR (Locus Control Region)**; un autre site, a été identifié en aval (3'HS1). Sur le chromosome 16, un site unique, **HS-40** contrôle l'expression des gènes de type α (Figure 8).

Les gènes des chaînes de globine sont donc sous le contrôle de locus régulateurs situés à très grande distance (environ 40-50000 paires de base) en amont de la partie 5' des gènes de globine. Ces régulateurs permettent l'activation de la transcription de gènes en venant à proximité du promoteur des gènes de globine par un repliement de la chromatine qui forme des boucles. (Schechter, Blood 2008) La liaison entre le régulateur et le promoteur des gènes de globine permet ensuite de recruter et d'activer l'ARN polymérase II afin de transcrire l'ARNm nécessaire à la synthèse des chaînes de globine. Par ailleurs, tout un groupe de protéines viennent intéragir avec le LCR et les séquences d'ADN des gènes de globine pour moduler l'expression des gènes de la famille β ce qui complique encore plus la compréhension de cette régulation.



<u>Figure 8</u> : Organisation des gènes de globine et des régions régulatrices de l'expression de ces gènes, sur leurs chromosomes respectifs. *LCR Locus Control* <u>Region, HS major upstream regulatory element (d'après Labie EMC hematol 2005)</u>

2.4.4. Régulation de la commutation entre hémoglobine fœtale et adulte

2.4.4.1. Intérêt thérapeutique du « switch » des chaînes de globine

La régulation de l'expression de certaines chaînes de globine notamment celles situées sur le chromosome 11 (type β), expliquant la présence ou non d'une hémoglobine adulte ou fœtale, est l'objet d'une intense recherche depuis 30 ans. (Schechter, Blood 2008) Ces cing dernières années, des publications majeures ont notamment porté sur la répression (silencing, en Anglais) des chaînes y (Sankaran, Science 2008, Nature 2009). Cette recherche peut avoir des répercussions thérapeutiques directes. En effet, les deux grandes maladies génétiques les plus fréquentes au monde (drépanocytose et β-thalassémie) sont dues à des mutations très limitées sur le gène de la chaîne β de globine : mutation ponctuelle remplaçant un seul nucléotide (A pour T) responsable de la modification d'un acide glutamique par de la valine en position 6 pour les formes les plus répandues de la drépanocytose, anomalies génétiques plus hétérogènes pour les β-thalassémies (plus de 200 mutations décrites). La réexpression de la chaîne γ (dont le gène n'est pas touché par cette/ces mutations) pour compenser le déficit qualitatif (pour la drépanocytose) ou quantitatif (pour la thalassémie) en chaîne β est donc une thérapie logique mais surtout « bio »logique. La physiologie humaine montre en effet que la compensation d'un déficit β par une ré-expression γ fonctionne puisque les patients drépanocytaires ne deviennent malades que vers l'âge de 6 mois lorsque toute leur hémoglobine fœtale a été remplacée par de l'hémoglobine adulte mutée. C'est la même chose pour les patients thalassémiques majeurs qui ne sont transfusés qu'au bout de quelques mois de vie. Enfin, des phénotypes particuliers de malades ayant constitutivement des concentrations élevées d'hémoglobine fœtale ou des malades traités par des molécules augmentant cette concentration (tel l'hydroxycarbamide ou le butyrate chez les patients drépanocytaires) améliorent considérablement la morbidité et mortalité de la maladie. (Higgs, Lancet 2012)

2.4.4.2. Régulation du « switch » : BCL11A et GATA-1

Comme on l'a souligné, les recherches et les progrès sont nombreux sur ce sujet, mais la régulation semble très complexe entre agents activateurs géniques et les répresseurs. Cela est d'autant plus compliqué qu'un répresseur des chaînes γ de globine, par exemple, peut lui-même être réprimé par une autre molécule, cette dernière augmentera donc, en cascade, l'expression de ces chaînes γ . Il est donc très difficile de rendre ce sujet synthétique, certainement car de nombreuses pièces du puzzle de cette régulation sont encore manquantes. Le but de ce chapitre n'est pas d'être exhaustif sur les mécanismes de régulation génétique de ce « switch », nous allons seulement mettre en avant le rôle de deux protéines majeures :

- BCL11A découvert en 2009 comme répresseur des chaînes γ par Sankaran (Sankaran, Nature 2009),
- et GATA-1, dont on reparlera largement dans cette thèse, car c'est le facteur de transcription majeur de l'érythropoïèse, protégé, comme nous l'avons vu, de l'activation des caspases par la chaperonne Hsp70 au cours de l'érythropoïèse. (Ribeil, Nature 2007) GATA-1 joue également un rôle fondamental dans la transcription des chaînes de globine. Cette fonction va être ici résumée. Cela a son importance pour mettre en perspective les résultats de ce travail de thèse.

BCL11A est le médiateur principal de l'inhibition d'expression des chaînes γ (Sankaran, Science 2008, Nature 2009). Cette protéine (dont le gène est sur le chromosome 2) était jusque-là connue pour réprimer la transcription dans la lignée lymphocytaire B. BCL11A est exprimé dans les érythroblastes sous deux isoformes. La plus longue est associée à une inhibition de l'HbF. (Sankaran, Science 2008) BCL11A se lie au LCR, au gène des chaînes de globine ε , et à la région située entre les gènes des chaînes γ et δ . Il fait partie d'un complexe formé par SOX6, GATA-1, FOG-1 (co-facteur transcriptionnel de GATA-1) et le complexe remodelage nucléosomal/histone deacétylase (NuRD). L'ensemble du complexe est nécessaire pour exercer son action répressive de la transcription des gènes de γ globine (figure 9). D'autres protéines semblent avoir aussi un rôle dans cette régulation et il est probable que d'autres acteurs restent encore à découvrir.



Figure 9 : « Silencing » des chaînes γ de globine par le complexe BCL11A, Sox6, GATA-1, FOG1 (ovale violet : zones de liaison de BCL11A sur le chromosome 11) (d'après Xu, Genes Dev. 2010)

GATA-1, facteur de transcription de l'érythropoïèse dont nous avons vu, dans le premier chapitre, le rôle majeur dans la survie et la différenciation/maturation érythroïde, a été initialement identifié à la fin des années 1980 pour sa liaison spécifique au promoteur de la β -globine humaine sur des séquences GATA de l'ADN. (Wall, Genes Dev. 1988) Il fut, dans la même période, démontré que GATA-1 se fixait à une séquence régulatrice de tous les gènes des différentes chaînes de globine du poulet (Evans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988), ce qui fut ensuite aussi prouvé chez l'homme. (Martin, Nature 1989 ; Watts, Nucleic Acids Res 1990, Gong, Mol. Cell Biol. 1991 ; Orkin, Blood 1992) Des sites de liaison de GATA-1 sont aussi présents dans les régions régulatrices (LCR) des gènes de globine. (Orkin, Blood 1992) Par ailleurs, plusieurs gènes codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'hème (porphobilinogen desaminase, acide aminolevulinique synthase 2...) sont des cibles de GATA-1. (Orkin, Blood 1992 ; Rylski, Mol. Cell Biol. 2003)

Même si GATA-1 apparaît comme un facteur de transcription fondamental des chaînes de globine, les études portant sur le rôle de GATA-1 dans l'ontogénie des chaînes de globine, notamment sur l'expression des chaînes γ , sont contradictoires.

GATA-1 est décrit le plus souvent comme **répresseur** (il prend place dans le complexe répresseur formé avec BCL11A (cf figure 9) (Sankaran, Cold Spring Harb Perspect Med 2013), mais aussi comme **activateur** des chaînes γ. (Yao, Exp. Hematol. 2009 ; Woon, Nucleic Acids Res. 2011; Zhu, Blood 2011) Il est donc probable que GATA-1 puisse avoir des actions différentes sur l'expression des chaînes de globines en fonction d'autres co-facteurs, du niveau de son expression et de l'environnement cytokinique.

2.4.4.3. Rôle des facteurs de croissance sur l'expression des chaînes γ de globine : Epo, SCF et TGF- β

L'**Epo** est un facteur qui, en permettant la maturation érythroïde, augmente considérablement la production d'hémoglobine. Cependant, l'Epo ne semble pas jouer directement sur l'expression des gènes de globine *in vitro* ni sur leur contrôle développemental (Schechter, Blood 2008), sauf en cas de sécrétion aiguë (pic d'Epo) où elle semble augmenter *in vivo* l'hémoglobine F (injection à des Babouins). (Blau, Blood 1993) L'injection chronique d'Epo à ces animaux ne semble pas avoir d'effet sur l'HbF. Chez l'homme sain, l'effet des injections d'Epo sur le pourcentage d'HbF n'a pas été, à notre connaissance, étudié alors que l'Epo semble y avoir un effet inducteur (modeste cependant) au cours des hémoglobinopathies.

Le **SCF et le TGF-** β semblent par contre avoir chacun un effet positif sur l'expression de l'HbF au cours de la différenciation d'érythroblastes humains normaux, *in vitro*, en milieu liquide ou semi-liquide (+15-20% pour le SCF). (Peschle, Blood 1993; Whojda, Blood 2003; Bhanu, Blood 2005; Revue dans Gabbianelli, Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis. 2009) Par ailleurs, ils exercent ensemble un effet synergique potentialisant l'expression de l'HbF. (Bhanu, Blood 2005) Cet effet du SCF a aussi été démontré dans des cultures d'érythroblastes humains β -thalassémiques intermédiaires ou majeurs en milieu liquide. L'addition du SCF (10 à 100 ng/L) à l'Epo permettait de stimuler la prolifération cellulaire, diminuer l'apoptose, ralentir la différenciation érythroïde terminale et de tripler la synthèse de chaînes de γ -globine (Gabbianelli, Blood 2008). Les mécanismes d'action du SCF ou TGF- β sur l'augmentation de l'HbF ne sont pas connus.

3. L'érythropoïèse inefficace des β -thalassémies majeures

3.1. Les β -thalassémies

Les thalassémies constituent avec la drépanocytose et la persistance héréditaire d'hémoglobine fœtale un groupe de maladies génétiques appelées hémoglobinopathies. Thalassémies et drépanocytoses sont les maladies héréditaires autosomiques récessives les plus fréquentes au monde. (Cao, Genet. Med. 2010 ; Higgs, Lancet 2012) Si au cours de la drépanocytose, les mutations en cause aboutissent à un déficit qualitatif (anomalie de structure) des chaînes de βglobine, les mutations des thalassémies ont pour conséquence un déficit quantitatif de production en chaînes α (α -thalassémie) ou β de globine (β -thalassémie). Ces déficits sont à l'origine de l'anémie qui caractérise ces maladies. Nous ne nous intéresserons ici qu'aux β -thalassémies.

La première description de la β -thalassémie a été faite par le Dr Thomas Cooley en 1925. Plus de 200 mutations (le plus souvent des mutations ponctuelles) ayant un impact sur la transcription de l'ADN en ARN, de l'épissage de l'ARN messager ou la traduction de l'ARN messager (codon non-sens, décalage du cadre de lecture) de la β -globine peuvent être à l'origine de β -thalassémies. (Cao, Genet. Med. 2010) Des mutations sur la région régulatrice (LCR) des gènes de globine ont aussi été décrites. (Higgs, Lancet 2012) (Figure 10)

β+-thalassémies



β⁰-thalassémies

Figure 10 : **Mutations responsables de β-thalassémies**. Dans la partie supérieure de la figure sont représentés les grands types de défauts moléculaires responsables d'une β^+ -thalassémie, et dans la partie inférieure ceux qui entraînent une β^0 -thalassémie (d'après Labie, EMC hematol 2005)

Ces nombreuses mutations expliquent une très grande hétérogénéité phénotypique. En effet, selon le type de mutation, un individu peut présenter trois types de maladie :

- les β -thalassémies mineures (hétérozygotes β/β^0 ou β/β^+), dont la découverte est le plus souvent fortuite lors d'un bilan d'une anémie minime et/ou une microcytose isolée avec hypochromie. Malgré une hémoglobine légérement abaissée, les globules rouges sont augmentés ce qui a fait autrefois utiliser le terme de « fausse polyglobulie microcytaire » pour décrire cette maladie. Ces patients ont un déficit de 50% de chaînes β , mais cela n'a pas de conséquence clinique pour eux. Ils sont par contre porteurs d'une mutation potentiellement dangereuse pour leur descendance.
- les β-thalassémies intermédiaires (β⁰/β⁺, β⁺/β⁺ ou β⁰/β^E) sont caractérisées par une anémie modérée (7-11 g/L), hypochrome (16-24 pg), microcytaire (VGM entre 50 et 80 fl) pouvant nécessiter de temps à autre des transfusions pour pallier à une aggravation brutale de l'anémie. Un facteur déclenchant est

alors souvent retrouvé (infection, grossesse, age...). Le risque principal chez ces patients est l'hémochromatose et ses conséquences graves (déficits endocriniens divers, diabète insulino-requérant, cirrhose, insuffisance cardiaque et troubles du rythme). La surcharge en fer chez des patients pas ou peu transfusés est liée à la dysérythropoïèse. Celle-ci inhibe la synthèse d'hepcidine ce qui entraîne une hyperabsorption intestinale de fer (cf chapitre 3.3.9.). La prise en charge de cette surcharge martiale est le plus grand défi thérapeutique chez ces patients. Cette thérapeutique est coûteuse et non dénuée d'effets secondaires potentiellement graves, ce qui pose un problème dans les pays en voie de développement ou soumis à la crise économique.

- les β -thalassémies majeures (β^0/β^0 , β^+/β^+ ou β^0/β^E) nécessitent pour vivre des transfusions régulières (environ toutes les 3 à 6 semaines pour maintenir une hémoglobinémie > 9,5 g/dL). En plus des complications potentielles liées aux transfusions répétées (infections, allo-immunisation, retentissement sur la qualité de vie...), ils sont très exposés aux complications de la surcharge martiale que nous venons d'évoquer. En l'absence de transfusion, les enfants meurent le plus souvent dans la première décade de vie. (Higgs, Lancet 2012) Avec ces transfusions bien menées et une chélation optimale en fer, la plupart des patients arrivent, dans les pays développés, à l'âge adulte et ont une espérance de vie qui se rapproche de la population générale.

Notons que les réticulocytes de ces patients β-thalassémiques majeurs et intermédiaires sont augmentés, mais à moindre niveau que d'autres anémies hémolytiques. (Nathan, Am J Med 1966)

La définition du type de thalassémie est donc clinique. Certains patients présentant une thalassémie intermédiaire peuvent, au cours de leur vie, changer de phénotype, nécessiter des transfusions régulières et devenir donc « majeure » (augmentation de la sévérité avec l'âge). Cependant, les patients avec β -thalassémie majeure typique appelée β^0 -thalassemie ou « maladie de Cooley » (le β^0 signifie absence de production des chaînes β , on utilise l'appellation β^+ lorsque des chaînes β -globine normales sont produites mais en quantité réduite) sont anémiques dès quelques mois de vie. Cela nécessite des transfusions régulières qui débutent dans les deux premières années de vie. (Cao, Genet Med 2010)

3.2. Anémie des β-thalassémies

La conséquence des mutations sur le chromosome 16 est le déséquilibre du ratio de production des chaînes α / β de globine (normalement presque équilibré à 1 à 1,05 ; en physiologie, léger excès physiologique de chaînes α). (Weiss, Blood 2009) Cela aboutit à un excès de chaînes α libres (appelée aussi apo α -globine), instables pouvant former des précipités hautement toxiques pour les cellules, que ce soit les érythroblastes de la moelle osseuse (thalassémie intermédiaire et majeure), ou dans les globules rouges du sang (thalassémie mineure et intermédiaire essentiellement). (Khandros, J. Biol. Chem. 2012) Les chaînes d' α -globine libres sont plus instables que les chaînes de β -globine libres, notamment car les chaînes β -globine libres ont une tendance plus marquée à s'associer entre elles en homo tétramères, structure plus stable. (Weiss, Blood 2009) Notons aussi que les chaînes des globines libres sont stabilisées par la fixation de l'hème. (Weiss, Blood 2009) Les chaînes l' α -hémoglobine (holo- α -globine) vont aussi s'oxyder (Fe³⁺) et précipiter. Les précipités sont donc formés d'apo- α globine (prédominante) et d'holo- α globine.

L'exès de chaîne α est bien corrélé avec la sévérité des β -thalassémies, beaucoup plus que le type de mutation en cause. (Weatherall, Nat Rev Genet 2001 ; Khandros Hematol Oncol Clin N A 2010 ; Cao, Genet. Med. 2010)

De très nombreuses études se sont focalisées depuis les années 1970 sur la régulation des gènes des chaînes de globine et sur les facteurs moléculaires et génétiques modulant le phénotype de la maladie. En effet, pour une même mutation, des phénotypes plus où moins sévères peuvent être observés, ce qui suggère que des modificateurs ou polymorphismes génétiques interviennent. (Weatherall, Nat. Rev. Genet. 2001) On peut trouver ainsi dans la même famille, pour la même mutation, des patients avec β -thalassémie intermédiaire peu transfusés et d'autres avec β -thalassémie majeure. Parmi les facteurs améliorant le phénotype des β -thalassémies, citons le génotype des chaînes d' α -globine (l'association à une α -thalassémie réduit la quantité de chaînes α libres dans les érythroblastes et érythrocytes) et le niveau d'expression de l'hémoglobine F. (Higgs, Lancet 2012) Nous n'aborderons pas dans ce travail tous ces nombreux travaux de génétique très axés sur la régulation des chaînes de globine dont nous avons brossé auparavant

quelques grandes caractéristiques. (Revue dans Cao, Genet. Med. 2010) Notons simplement qu'historiquement, 10 ans après la découverte de la structure cristallographique des chaînes de globine dans les années 1960 qui fut un tournant de la biochimie humaine, la biologie moléculaire a fait de grands progrès à ses débuts, dans les années 1970, grâce à ces études dans la thalassémie. (Higgs Lancet 2012)

Nous allons axer maintenant notre propos sur le sujet de cette thèse qui est de mieux comprendre la physiopathologie de l'érythropoïèse inefficace des patients β -thalassémiques. En effet, il est bien admis que c'est cette dysérythropoïèse qui est la source principale de l'anémie des patients. C'est particulièrement vrai pour les thalassémies majeures (β^0) que nous étudierons dans ce travail puisque, chez ces patients, la majorité des érythroblastes contenant des chaînes α libres meurent d'apoptose lorsque l'hémoglobinisation dans les érythroblastes devient maximale. Les seuls réticulocytes qui quittent la moelle osseuse (et donc les seuls globules rouges) sont dont presque essentiellement (97-98%) des cellules dites « F » (F cells) contenant de l'hémoglobine fœtale (pour les formes β^0 thal).

Au cours des β -thalassémies intermédiaires (et certaines β -thalassémies majeures) où une certaine production de chaînes β existe (β^+) où au moins une chaîne alternative (β^E), l'anémie (moins marquée) est la résultante de l'érythropoïèse inefficace (moins sévère qu'au cours des formes majeures) mais aussi de l'hémolyse périphérique des globules rouges ayant un excès de chaînes α cytoplasmiques « cohabitant » avec des complexes d'hémoglobine A normale ($\alpha^2\beta^2$). Le pourcentage d'hémoglobine fœtale totale et le pourcentage de cellules F chez ces patients β thalassémiques intermédiaires est variable (10-50%, parfois plus). La distribution de l'hémoglobine F par cellule est très hétérogène, variant d'une cellule à l'autre. (Nathan, Am J Med 1966 ; Boyer, Science 1975)

3.3. Dysérythropoièse des β-thalassémies

Comme nous l'avons vu, à côté du problème du type de mutation génétique et des génétiques additionnels modifiant nombreux facteurs le phénotype, la physiopathologie commune des β -thalassémies est marquée par une dysérythropoïèse. Les études sur le sujet sont peu nombreuses par rapport aux travaux de génétique ou des travaux sur le métabolisme des globules rouges de ces patients et sont très souvent descriptives. Les mécanismes moléculaires précis expliquant les anomalies de l'érythropoïèse par l'excès relatif de chaînes d'α-globine libre, ne sont pas déterminés précisément.

Nous allons donc maintenant faire une revue de la littérature sur cette dysérythropoïèse.

3.3.1. Caractéristiques de la dysérythropoïèse des β-thalassémies 3.3.1.1. Historique

Cette dysérythropoïèse est suspectée depuis les années 1950 car il avait été bien observé que les patients β -thalassémiques majeurs, peu ou mal transfusés présentaient une expansion médullaire pouvant aboutir à de véritables tumeurs médullaires, des déformations osseuses, une érythropoïèse extraosseuse et une splénomégalie. (cf photo illustrant de multiples expansions de moelle osseuse à travers le trou de conjugaison des vertèbres du rachis dorsal)



Des études cinétique du fer radioactif des années 1950 montraient déjà que l'hémolyse périphérique ne pouvait à elle seule rendre compte de l'anémie des patients. (Finch, Blood 1957) Dans les années 1970, la même équipe montrait, par des études ferrocinétiques étudiant l'incorporation du ⁵⁹Fe dans les globules rouges nouvellement synthétisés, qu'environ 60 à 80% des précurseurs érythroblastiques avaient arrêté de proliférer et/ou mourraient. (Finch, Medicine 1970)

Plus tard, il fut démontré une hyperplasie érythroïde. La moelle des patients βthalassémiques contient cinq à six fois plus de précurseurs érythroïdes que des contrôles sains (Centis, Blood 2000), avec une augmentation des érythroblastes basophiles et polychromatophiles ainsi qu'une diminution des acidophiles. (Yuan, Blood 1993 ; Centis, Blood 2000 ; Mathias, Experimental Hematology 2000 ; revue dans Schrier, Curr Opin Haematol 1997) De plus, il a été montré, dans les années 1970, par microscopie électronique, que la moelle osseuse contient, dès les premières cellules du stade polychromatophile, des érythroblastes avec des inclusions denses. Ces inclusions augmentent en taille et fréquence dans les stades ultérieurs de différenciation et sont localisées en position juxta-nucléaire en association avec les centrioles. (Wickramasinghe, Br. J. Haematol. 1975 et 1982) (figure 11)



<u>Figure 11</u> : Inclusions de chaînes α dans un érythroblaste polychromatophile en microscopie électronique (d'après Higgs, Lancet 2012).

3.3.1.2. Caractéristiques de la dysérythropoïèse

Ces différentes études résument les caractéristiques de la dysérythropoïèse des β -thalassémies chez l'homme (schématisés sur la figure 12):

- expansion des progéniteurs précoces (en amont du proérythroblaste),

- **érythropoïèse inefficace** lors de l'érythropoïèse terminale qui elle-même comprend trois anomalies distinctes :

- accélération de la différenciation érythroïde jusqu'au stade polychromatophile,
- arrêt de maturation au stade polychromatophile,
- et mort par apoptose. (Mathias, Experimental Hematology 2000 ; Yuan, Blood 1993 ; Centis, Blood 2000 ; Leecharoenkiat, Blood Cells Mol. Dis. 2011 ; De Franceschi, Haematologica 2011)

L'érythropoïèse inefficace se définit comme une production sub-optimale d'érythrocytes matures à partir d'un pool de cellules immatures proliférantes.



<u>Figure 12</u> : Dysérythropoïèse des β -thalassémies majeures. Expansion des progéniteurs précoces puis érythropoïèse inefficace (Pro-E : proérythroblastes)-schéma publié par Ribeil JA et Arlet JB et col. ScientificWorldJournal 2013 adapté de Y. Beuzard

L'expansion des progéniteurs est attribuée à la synthèse accrue d'Epo chez ces patients avec anémie chronique. (Lacombe, J. Clin. Invest. 1988, et chapitre 3.3.9)

Les mécanismes expliquant l'accélération de la différenciation jusqu'au stade polychromatophile, puis l'arrêt de maturation à ce stade de différenciation ne sont, à ce jour, absolument pas connus. Nous allons proposer dans ce travail de thèse une explication pour la deuxième composante (arrêt de maturation). L'induction d'une mort cellulaire au stade polychromatophile, où la concentration en hémoglobine augmente le plus fortement, est plus facilement compréhensible par l'excès de chaînes d'a-globine libres. Cependant, le mécanisme précis de la toxicité induite par les chaînes d'a-globine libres dans les érythroblastes est assez spéculatif comme nous allons maintenant le voir.

3.3.2. Mécanisme de mort cellulaire des érythroblastes β -thalassémiques : l'apoptose

Le mécanisme de mort des précurseurs érythroblastiques β -thalassémiques a été identifié dans les années 1990. Il a été montré, chez l'homme, que ces cellules présentaient une apoptose augmentée (environ 3 à 4 fois comparé à des contrôles sains) ce qui n'était pas le cas des précurseurs lymphoïdes et myéloïdes. Cela a été bien identifié dans la moelle osseuse de patients β-thalassémiques mais aussi dans des modèles de souris par une augmentation de la fragmentation de l'ADN (DNA laddering, signe d'un clivage de l'ADN nucléosomal augmenté), et confirmé plus tard par technique de marquage TUNEL et, de manière plus précise, par marquage membranaire érythroblastique par Annexine V par analyse FACS. (Yuan, Blood 1993; Mathias, Experimental Hematology 2000; Centis, Blood 2000; Pootrakul, Blood 2000) L'étude de cultures *in vitro* de cellules β-thalassémiques humaines par Mathias et col. en 2000 a été déterminante pour bien préciser les caractéristiques de cette érythropoïèse inefficace. Ces auteurs ont bien démontré que l'expansion cellulaire était diminuée au cours de l'érythropoïèse terminale et que cela est dû à une accélération de différenciation, puis un arrêt de maturation associé à une stade polychromatophile. apoptose augmentée au (Mathias, Experimental Hematology 2000)

Par ailleurs, cette apoptose est associée à une augmentation en nombre et une activation des macrophages médullaires dont on connaît bien le rôle de phagocytose des globules rouges et des érythroblastes exprimant la phosphatidyl-sérine membranaire (marqueur d'apoptose). Cette phagocytose est environ deux fois plus importante que chez des sujets sains. (Centis, Blood 2000; Angelucci, Haematologica 2002; Kuypers, Cell Mol. Biol. 2004)

3.3.3. Voies d'apoptose impliquées dans les β -thalassémies

Celles-ci ont été très peu étudiées. Aucune étude n'existe chez l'homme et une seule est disponible chez la souris β -thalassémique intermédiaire. Dans ce modèle, Fas et FasL sont co-exprimés précocement à tous les stades de la différenciation terminale. (Liu, Blood 2006) Les deux protéines sont cependant sous-exprimées dans les proérythroblastes et les basophiles de la moelle et de la rate de ces souris comparées à des contrôles, in vivo. Il ne semble pas exister de différence d'expression statistiquement significative dans les érythroblastes plus matures comparé à des contrôles (souris saines). Cette régulation négative de Fas/FasL pourrait être un marqueur d'érythropoïèse de stress chez la souris. (Liu, Blood 2006) Il n'est donc pas du tout certain, sur la base de données actuelles, que la voie l'apoptose soit activée pour expliquer extrinsèque de l'apoptose des polychromatophiles.

La voie mitochondriale de l'apoptose devrait être plus logiquement activée puisqu'elle est sensible à des stimulus toxiques comme les réactifs oxydants (ROS). (Circu, Free Radic Biol Med 2010 ; Schrier, Redox Rep 2003) Cependant, cette voie n'a pas été précisément étudiée. Nous avons pu montrer cependant au cours de nos expériences de thèse, par cytométrie de flux (données non montrées dans la suite de ce manuscrit), que la voie mitochondriale était activée précocement au cours de la différenciation terminale (dépolarisation de la mitochondrie dès J3 de nos cultures CD36).

3.3.4. Rôle des dérivés oxydants (ROS) dans la physiopathologie de la thalassémie

L'excès de chaînes α-hémoglobines génère des espèces oxydantes (ROS)

Le stade de différenciation où apparaît une apoptose importante au cours des β thalassémies est le stade polychromatophile. C'est, comme nous l'avons vu, le stade de différenciation où la concentration en chaînes de globine augmente le plus fortement. Ainsi la mortalité cellulaire à ce stade semble particulièrement liée à l'accumulation des chaînes d'a-globine libres (appelé aussi apo a-globine) qui, non associées avec β en tétramères, sont très instables et vont précipiter et former des agrégats toxiques pour la cellule. Ceux-ci, que l'on peut identifier sous la forme de corps de Heinz, peuvent être plus où moins importants en taille et en nombre suivant la concentration des chaînes α libres. (Nathan, Am. J. Med. 1966 ; Wickramasinghe, Br. J. Haematol. 1975) Les mécanismes précis de toxicité de ces agrégats ne sont pas connus.

Les corps de Heinz correspondent à des inclusions détectées dans les globules rouges, accolés à la membrane cytoplasmique, par une coloration d'un frotti sanguin au bleu de crésyl brillant ou au cristal violet (dénommé aussi méthyl-violet). Ils portent aussi le nom de corps de Ehrlich-Heinz, d'« inclusion bodies » et ne sont pas du tout spécifiques des β -thalassémies puisqu'ils peuvent se voir également dans les globules rouges d' α -thalassémies, de drépanocytose, d'autres anémies hémolytiques (déficit en G6PD...) et après prise de nombreux toxiques. (Webster, Blood 1949)

À côté des chaînes α libres, les chaînes d' α -hémoglobine appelées aussi holo α globines (α -globines liées à l'hème qui contient du fer ferreux \mathbf{Fe}^{2+}), ont tendance à s'auto-oxyder ce qui va les dénaturer et donner *in fine* des hémichromes (α hémoglobine oxydée et dénaturée avec Fer sous forme ferrique \mathbf{Fe}^{3+}). Ces **hémichromes**, précurseurs également de corps de Heinz, sont un terme générique qui désigne de l'hémoglobine oxydée et dénaturée (cela peut être aussi l'hémoglobine entière HbA). Ils peuvent être mis en évidence par spectométrie et, indirectement, par les colorations sur frotti permettant d'identifier les corps de Heinz. On a longtemps cru qu'ils n'étaient présents qu'en pathologie mais une faible proportion est aussi présente en physiologie dans des globules rouges vieillis. (Rifkind, Methods Enzymol. 1994)

Ces hémichromes génèrent, au moins dans les érythrocytes, des ROS qui endommagent les protéines cellulaires, lipides et acides nucléiques. (Kong, J. Clin. Invest. 2004)

Les études s'intéressant à la production de ROS au cours de la différenciation érythroïde terminale dans les β-thalassémies sont rares. (Shinar, Semin. Hematol. 1990) Il a été montré une augmentation significative de la production de ROS dans les précurseurs érythroïdes précoces et tardifs comparée à des érythroblastes normaux dans la β -thalassémie intermédiaire (De Franceschi, Haematologica 2011) ou β-thalassémie/HbE. (Leecharoenkiat, Blood Cell Mol. Dis. 2011) S'il est facile de comprendre que l'excès de ROS, en endommageant les composants cellulaires des globules rouges puisse diminuer la durée de vie de ces cellules et induire une clairance prématurée par hémolyse (un phénomène passif) (Kong, J. Clin. Invest. 2004), il n'y a pas de preuve solide que la production de ROS soit la cause de l'apoptose dans les précurseurs érythroblastiques β-thalassémiques (un processus programmé et actif de mort cellulaire (Schrier, Curr. Opin. Hematol. 2002)). Il faut insister sur le fait que dans les quelques études (peu nombreuses) effectuées chez l'homme sur la cinétique de production de ROS au cours de la différenciation érythroïde terminale, il est observé soit aucune différence (De Franceschi, Haematologica 2011), soit une baisse importante (Leecharoenkiat, Blood Cell Mol. Dis. 2011) des niveaux de ROS au cours de la différenciation. Ces observations plaident donc contre un lien direct entre ROS et apoptose puisque l'apoptose survient en fin de différenciation où les niveaux de ROS ne sont pas plus élevés qu'au début de la différenciation, voire plus bas. Le lien entre ROS et apoptose dans les cellules érythroïdes humaines n'a donc jamais été démontré même si c'est l'explication souvent avancée pour expliquer l'érythropoïèse inefficace, par extrapolation des études sur la toxicité des hémichromes et des ROS sur la membranes des globules rouges.

L'activation des ROS (dont la concentration est comme on l'a vu augmentée au cours de l'érythropoïèse thalassémique) peut, dans d'autres modèles cellulaires, activer les voies extrinsèque (Fujisawa, Mol. Biotechnol. 2007) mais aussi intrinsèque des caspases via l'intéraction avec des protéines de perméabilité

67

mitochondriale. (Circu, Free Radic Biol. Med 2010) Cela pourrait donc rendre compte de l'activation précoce de la voie mitochondriale de l'apoptose (hypothèse et données personnelles), mais pas de la mort importante et brutale au stade polychromatophile, alors même que la production de ROS est augmentée déjà depuis des stades érythroblastiques précoces et ne semble pas augmenter ensuite. D'un autre côté, le rôle des ROS dans l'accélération érythroïde, une autre caractéristique de l'érythropoïèse inefficace, est à envisager (Leecharoenkiat, Blood Cell Mol. Dis. 2011) d'autant que l'utilisation d'anti-oxydants inhibe la différenciation *in vitro* de progéniteurs érythroïdes dérivés de foie fœtal de souris de type sauvage. (Nagata, Cell Biol. Int. 2007) Le rôle des ROS dans l'induction de la maturation érythroïde physiologique induite par l'Epo est posé par ces expériences chez la souris. Il serait intéressant à étudier en physiologie humaine et au cours des β thalassémies.

3.3.5. L'anomalie de structure membranaire pourrait-elle expliquer la mortalité cellulaire au stade polychromatophile ?

II a été démontré dans les globules rouges de thalassémies intermédiaires que les précipités de chaînes d'α-globine associées à l'hème libre, au fer oxydé et aux protoporphyrines (constituant comme on l'a vu, les hémichromes) se liaient à la membrane des érythrocytes et à d'autres organites cellulaires, ce qui altérait la stabilité, l'hydratation et la déformabilité de la membrane du globule rouge et désorganisait le cytosquelette. De plus, cela augmente la propagation de la production de ROS toxiques pour les organites intracellulaires (cf supra). (Shinar, Semin Hematol 1990) Cela pourrait donc expliquer l'hémolyse périphérique de ces patients en fragilisant la membrane et le cytosquelette des érythrocytes. (Schrier, Blood 1989 ; Yuan, Blood 1992) De plus, les hémichromes co-polymérisent avec les molécules de bande-3 sur la membrane des globules rouges ce qui les regroupe et crée un néoantigène qui peut lier des IgG et le complément. (Yuan, Blood 1992 ; Schrier, Curr. Opin. Hematol. 2002) Le complexe IgG/complément pourra être ensuite reconnu par les macrophages qui élimineront ces globules rouges ainsi ciblés. (Figure 13)



- 1. Oxidative denaturation of hemoglobin leading to hemichrome formation
- 2. Hemichrome binding to band 3 cytoplasmic domain cause their oxidative cross-linking through disulfide bonds and their tyr phosphorylation
- 3. Band 3 dissociation from cytosceletal proteins and its clusterisation
- 4. Formation of large band 3/hemicromes clusters and opsonisation by NAbs and C3b

<u>Figure 13</u> : Toxicité des hémichromes vis à vis de la bande-3 sur les globules rouges (d'après Pantaleo, Autoimmun. Rev. 2008)

Cette toxicité plus ou moins directe de l'accumulation d' α -globine sur la membrane des érythroblastes est-elle en cause dans la dysérythropoïèse des β -thalassémies?

Quelques éléments plaident pour un possible rôle de ces altérations même si les arguments et travaux dans l'érythropoïèse sont beaucoup moins étoffés que pour l'hémolyse périphérique et emportent peu la conviction. L'implication de ce mécanisme dans le processus d'érythropoïèse inefficace paraît mineur.

Il semble exister, dans l'érythropoïèse précoce des β -thalassémies majeures, un déficit d'assemblage de la **protéine transmembranaire bande-3** aux stades de proérythroblastes et d'érythroblastes basophiles, non lié dans l'espace aux dépôts de chaînes d' α -globine. Ce déficit en bande-3 semble disparaître dans les stades d'érythroblastes polychromatophiles et acidophiles où son expression membranaire est diffuse, non liée aux agrégats d' α -globine. (Aljurf, Blood 1996) La cinétique d'aquisition de la bande-3 membranaire reste celle d'une augmentation constante avec la différenciation mais semble, sur ces travaux de microscopie confocale, moins intense (au moins avant le stade acidophile) que celle de cellules contrôles. Le rôle potentiel de la bande-3 dans l'érythropoïèse inefficace des β -thalassémies majeures

apparaît donc beaucoup moins central que ce qui a été démontré dans les globules rouges de β-thalassémies intermédiaires.

La **protéine 4.1** est une composante importante du cytosquelette membranaire, qui lie la partie intracytoplasmique de la bande-3. Elle est partiellement oxydée dans les érythroblastes matures des souris β -thalassémiques. (Advani, Blood 1992) Les dépôts d'a-globine semblent également co-localiser avec cette protéine 4.1. dans les érythroblastes humains β -thalassémiques majeurs et modifient de façon importante sa distribution cytoplasmique. (Aljurf, Blood 1996 ; Schrier, Curr. Opin. Hematol. 1997) La spectrine, autre protéine du cytosquelette, co-localise aussi avec l'a-globine.

Ces études descriptives, même peu nombreuses, semblent montrer qu'il existe, dans les érythroblastes β -thalassémiques, des anomalies sur des protéines importantes pour l'intégrité membranaire. Cela explique l'hypothèse, très répandue dans la littérature, que l'accumulation des chaînes d'a-globine déstabilise la membrane des érythroblastes et participe à l'érythropoïèse inefficace. Cela pourrait expliquer une mort par nécrose ou par un processus auto-immun contre la bande-3 (cependant jamais démontré dans les érythroblastes), associé à une élimination macrophagique. Mais cela ne peut pas être l'explication mécanistique de l'augmentation importante d'apoptose, phénomène de mort cellulaire actif, observé dans des modèles de cultures de cellules β-thalassémiques humaines en dehors de toute présence de macrophages. (Yuan, Blood 1993; Schrier, Curr. Opin. Hematol. 1997) Enfin, contrairement aux globules rouges, il a été montré que les agrégats de chaînes d'aglobine (« inclusion bodies ») étaient localisés près du noyau dans les centrioles des érythroblastes à partir du stade polychromatophile et non accolés à la membrane cytoplasmique, ce que nous avons aussi observé dans nos expériences. (Wickramasinghe, Br. J. Haematol. 1975 et 1982) Cette localisation juxtanucléaire des agrégats protéiques est d'ailleurs assez générale en biologie, formant une structure cytoplasmique récemment dénomé « agrégasome ». (Weisberg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012) On ne peut exclure cependant que des foyers de chaînes d'aglobine libres, éventuellement oxydées, non encore regroupées en agrégats de grande taille visualisables, puissent intéragir avec des protéines de la membrane érythroblastique comme ce qui a été montré avec la protéine 4.1 (cf supra).

70

3.3.6. Rôle de la chaperonne AHSP (α-Hemoglobin–stabilizing protein)

L' α -hemoglobin-stabilizing protein (AHSP) appelée aussi ERAF (erythroid-associated factor) est une protéine chaperonne spécifique des chaînes d' α -globine découverte il y a 10 ans par l'équipe de Mitchell Weiss aux Etat-Unis (2002). (Kihm, Nature 2002) Des études d'intéraction protéique ont démontré qu'elle se liait spécifiquement aux chaînes d' α -globine libres (sans hème=apo α -globine) (Yu, J Clin Invest. 2007) mais aussi à l' α -hémoglobine dans sa forme réduite (Fe²⁺) (holo α -globine réduite) ou oxydée Fe³⁺ (holo α -globine oxydée), mais ni aux chaînes β , ni aux dimères $\alpha\beta$, ni au tétramère d'HbA. (Gell, J Biol. Chem. 2002 ; Kihm, Nature 2002 ; Weiss, Blood 2009 ; Mollan, J Biol Chem 2012) Elle se lie à l' α -globine ferrique (oxydée) avec 100 fois plus d'affinité qu'avec l' α -globine ferreux. (Gell, J Biol Chem 2002 ; Khandros, J Biol Chem. 2012)

L'AHSP stabilise les chaînes d' α -globine (Kihm, Nature 2002 ; Zhou, J Biol. Chem. 2006) et diminue la production de ROS induite par les chaînes d'holo- α -globine. (Kong, J. Clin. Invest. 2004)

L'AHSP est une petite protéine globulaire de 11,8 kilodalton, monomérique en solution, formée de 102 acides amines dont l'expression est sous la dépendance du facteur de transcription GATA-1. (Kihm, Nature 2002 ; Gell, J Biol. Chem. 2002) Elle forme une structure formée de 3 hélices α qui se lient à l' α -globine sur sa partie opposée à la poche contenant l'hème pour former un hétérodimère. Une protéine d'AHSP se lie à une protéine d' α -globine. (Gell, J Biol. Chem. 2002) L'AHSP se lie aux hélices G et H de l' α -globine, surface d'intéraction en partie commune avec celle de la β -globine. (Mollan, J Biol. Chem. 2012) Cependant, la β -globine lie l' α -globine avec plus d'affinité et sur une plus large surface que l'AHSP. (Kihm, Nature 2002 ; Weiss, Blood 2009 ; Mollan, J Biol. Chem. 2012) La constante de dissociation (K_d) entre l'AHSP et l' α -globine est de 0,5 μ M (Kihm, Nature 2002), la constante d'association (K_A) de 1 X 10⁷ M⁻¹. (Gell, J Biol. Chem. 2002) L'AHSP a essentiellement été étudiée dans les globules rouges circulants et les réticulocytes (chez l'homme ou dans des modèles murins) bien que la fonction qu'on lui prête semble se situer à deux niveaux :
(1) l'assemblage des chaînes de globine pour former l'hémoglobine : l'AHSP se lierait à l'apo- α -globine libre naissante, la stabiliserait, dans une conformation native pour être ensuite déplacée par la chaîne β pour former le tétramère d'Hb (Yu, J. Clin. Invest. 2007 ; Weiss, Blood 2009).

(2) contrer l'effet potentiellement néfaste de l'excès physiologique (même infime) des chaînes α -globine libres, potentiellement toxiques (ratio α/β globine légèrement supérieur à 1 en physiologie (cf supra)) (Kong, J. Clin. Invest. 2004; Weiss, Blood 2009). Dans ce deuxième rôle, l'AHSP pourrait être utile en pathologie pour chaperonner les chaînes d' α -globine libres en excès dans les β -thalassémies et éviter leur précipitation que ce soit dans les cellules érythroblastiques ou dans les globules rouges.

Les expériences princeps décrivant cette chaperonne, publiées dans Nature, ont portées uniquement sur des études dans les globules rouges et sur l'intéraction entre les deux protéines. De façon surprenante, l'expression de l'AHSP au cours de la différenciation érythroblastique a été très peu étudiée alors même que l'on attribue un rôle fondamental de cette protéine dans les érythroblastes puisqu'un rôle dans l'assemblage de l'hémoglobine est mis en avant. Une seule étude s'est intéressée à l'expression génique de l'AHSP par PCR au cours de la différenciation érythroïde terminale humaine normale in vitro dans une culture en milieu liquide. L'expression génique semble augmenter dans les érythroblastes proportionnellement avec la différenciation érythroblastique et semble plus abondante stades aux d'érythroblastes polychromatophiles et acidophiles. (Dos Santos, 2004) Une autre équipe a étudié l'expression de l'ARNm des chaînes de globine et de l'AHSP au cours de l'érythropoïèse humaine in vitro. Ces auteurs ont montré une augmentation également continue mais avec une expression d'ARNm de l'AHSP plus de 100 fois plus faible que celle de l' α -globine.

L'augmentation de l'AHSP avec la différenciation érythroïde dans cette étude semble très modérée et non significative. (Varricchio, Transfusion 2010) Aucune publication n'étudie précisément, à notre connaissance, l'expression protéique de l'AHSP suivant les stades de différenciation érythroïde chez l'homme. L'étude initiale de Kihm nous révèle qu'il y aurait 10⁷ molécules de l'AHSP par progéniteurs érythroïdes dans des lignées érythroïdes (environ 0,1 mM dans des proérythroblastes contre ~5-

77

10 mM pour l'HbA- les concentrations des chaînes α et β libres ne sont pas connues), mais ces données ne sont pas montrées ni dans cet article ni dans aucun des très nombreux articles publiés par cette équipe sur le sujet (Kihm Nature 2002 ; Gell, J Biol Chem 2002). La même équipe de M. Weiss, dans une excellente revue sur le rôle des chaperonnes dans l'érythropoïèse publiée en 2009 dans Blood, prétend que des études biochimiques montreraient que l'AHSP aurait un rôle dans l'assemblage de l'HbA (aucune référence n'est apportée, probables données personnelles), mais ils admettent qu'il est difficile de purifier de grande quantité de complexes AHSP/a-globine dans les cellules érythroïdes. Ils avancent comme explication que cela pourrait être dû à une concentration faible (alors qu'ils parlent dans leur article initial dans Nature d'une protéine abondante dans l'érythropoïèse) et de sa fonction transitoire. La faible expression de l'AHSP, si elle est confirmée, est un peu surprenante dans l'hypothèse d'un rôle important de l'AHSP pour l'assemblage de l'hémoglobine car cette dernière est une protéine produite en grande quantité dès le stade d'érythroblastes basophiles/polychromatophiles ce qui nécessiterait, a priori, des concentrations importantes de chaperonne à ces stades de différenciation. Il faudrait sinon considérer que son rôle dans l'assemblage de l'HbA soit si transitoire qu'une molécule de l'AHSP pourrait servir de nombreuses fois à chaperonner des chaînes d' α -globine naissantes. Dans ce cas, pourquoi l'expression génique serait maximale au stade polychromatophile/acidophile, alors même qu'à ces stades le tétramère d'hémoglobine est déjà en grande partie formé? Une chaperonne spécifique des chaînes naissantes devrait plus logiquement être impliquée à un stade antérieur, au tout début de production des chaînes de globine (proérythroblaste ou plutôt basophile). Enfin, il est étonnant que l'équipe de M Weiss n'ait pas étudié l'expression protéique de l'AHSP ou du complexe AHSP/a-globine dans les érythroblastes de patients β-thalassémiques majeurs. Celle-ci devrait être élevée puisque ne sont présentes, dans une majorité des cellules de ces patients, que des chaînes d' α -globine, sans chaînes β pouvant entrer en compétition avec l'AHSP pour la liaison avec les chaînes α. Une équipe Italienne a d'ailleurs montré dans 2 études différentes (cependant très discutables méthodologiquement) que l'ARNm de l'AHSP était significativement augmenté dans les érythroblastes humains matures de patients β° -thalassémiques majeurs cultivés *in vitro* par rapport à des sujets sains. (Varricchio, Transfusion 2010; Mai, Mol. Pharmacol. 2007) Les études

protéiques ne sont, à notre connaissance, toujours pas disponibles. Le rôle de l'AHSP dans l'assemblage des chaînes de globine n'est donc qu'hypothétique et non démontré à ce jour dans des modèles d'érythropoïèse humaine. Le rôle de l'AHSP pourrait en fait se situer plus tardivement, dans des érythroblastes très matures ou les érythrocytes les protégeant de l'hémolyse périphérique. Les données sur le rôle protecteur de l'AHSP dans les globules rouges sont en effet beaucoup plus convaincantes.

Dans les souris β-thalassémiques intermédiaires, la perte de l'AHSP aggrave l'anémie des souris. (Kong, J. Clin. Invest. 2004) Les souris déficientes pour l'AHSP (AHSP⁻/⁻) présentent une anémie hémolytique modérée et une précipitation de l'hémoglobine dans les globules, mais aussi une proportion élevée de précurseurs érythroïdes, une maturation érythroïde légèrement déficiente et une apoptose augmentée. Ces données phénotypiques ressemblent à ce que l'on observe dans l'érythropoïèse inefficace des β-thalassémies. (Kong, J. Clin. Invest. 2004) L'effet de l'invalidation de l'AHSP sur la maturation terminale ne semble pas significative sur une autre étude. (Yu, J. Clin. Invest. 2007) À noter toutefois que l'apoptose dans l'étude de Kong et al a été réalisée uniquement par marguage immunohistochimique TUNEL sur la rate de souris. Aucune autre méthode d'étude d'apoptose n'a été utilisée. Ces éléments semblent être, pour les auteurs, un argument pour un rôle joué par l'AHSP dans l'érythropoïèse. (Kong, J. Clin. Invest. 2004) Cependant, il faut souligner que, dans ce modèle de souris totalement invalidées pour AHSP, l'anémie est modérée (Hb=14,5 vs 16,9 g/dl) et que celle-ci est due en grande part à de l'hémolyse périphérique. Cela peut être considéré comme un argument négatif pour un rôle majeur de l'AHSP dans l'érythropoïèse physiologique.

Enfin, le rôle de l'AHSP dans la pathologie humaine est une question ouverte. Des mutations naturelles qui invalident l'expression de l'AHSP ou altèrent sa structure protéique sont rares (Dos Santos, Am. J. Hematol. 2008 ; Viprakasit, Blood 2004). Les variations d'expression d'ASHP chez l'homme sont fréquentes (Dos Santos, Am. J. Hematol. 2008). Une relation de causalité entre baisse de l'AHSP et la sévérité des β -thalassémies n'a pas été, à ce jour, démontrée. Les données sont en effet divergentes (Weiss, Blood 2009).

3.3.7. Rôle de l'hème et des inhibiteurs de l'hème

L'hème a un rôle dans la stabilisation et solubilisation des chaînes d' α -globine (apoglobine) qui, sans hème, sont beaucoup plus instables et ont tendance à précipiter et former des agrégats. C'est, en soi, un système de chaperonne des chaînes α . (Weiss, Blood 2009)

Il existe au cours de la β -thalassémie une augmentation de production d'hème dans les érythroblastes précoces, mais l'hème est par contre significativement réduit dans des érythroblastes matures par rapport à des érythroblastes de contrôles sains. (De Franceschi, Haematologica 2011) Cela est un argument supplémentaire contre la théorie de l'oxydation cellulaire pour expliquer l'apoptose des érythroblastes polychromatophiles puisque l'hème et, comme nous l'avons vu, les ROS sont diminués par rapports aux stades plus précoces et non augmentés comme le voudrait cette théorie.

Cette réduction de synthèse d'hème peut être paradoxalement un mécanisme protecteur dans une situation où l'hème cellulaire est limité (Weiss, Blood 2009)

(1) en diminuant les effets cytotoxiques d'un excès d'hème libre cellulaire ayant un potentiel oxydant (peut se transformer en hémine délétère pour la cellule),

(2) en modifiant deux protéines qui répriment l'expression des chaînes de globine. En effet, l'hème inhibe le facteur de transcription Bach I et HRI (Heme regulated inhibitor of translation). Ces deux protéines répriment la transcription des chaînes α et β . (Tahara, J Biol. Chem. 2004 ; Tahara, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004 ; Weiss, Blood 2009 ; Chen, Blood 2007) Un déficit en hème va donc rendre actives ces protéines ce qui, en cascade, va diminuer la synthèse des chaînes d' α -globine libres (apo- α -globine), ce qui est un avantage évident dans le cas de la β thalassémie. (Weiss, Blood 2009 ; Chen, Blood 2007) De façon intéressante, les chaperonnes Hsc70 et Hsp90 augmentent l'expression/activité de HRI. (Uma, J Biol. Chem. 1997 ; Uma, Mol. Cell Biol. 1999) D'autres moyens cytoprotecteurs ont probablement été développés par les érythroblastes β -thalassémiques comme la protéine PRDX2, exprimée abondamment au cours de l'érythropoïèse β thalassémique. Cette protéine se lie à l'hème dans les précurseurs érythroïdes matures de l'hème libre et permettre indirectement comme on l'a vu, une diminution des chaînes d'α-globine libres. (De Franceschi, Haematologica 2011)

Enfin, de nombreux travaux ont montré à partir de la fin des années 1970, un rôle important de l'hémine (hème dans sa forme oxydée) comme accélérateur de la différenciation érythroïde. (Bonanou-Tzedaki, Cell Different 1981 ; Theodorakis, Mol Cell Biol. 1989 ; Bensaude, Nature 1983) Cette propriété est utilisée pour accélérer la différenciation des lignées érythroïdes K562. Ce rôle de l'hème oxydé dans l'accélération de la différenciation érythroïde des β -thalassémies n'a pas été à notre connaissance étudié. Pourtant, l'utilisation d'anti-oxydants inhibe la différenciation *in vitro* de progéniteurs érythroïdes dérivés de foie fœtal de souris de type sauvage. (Nagata, Cell Biol. Int. 2007) Cela pourrait passer non seulement par le blocage des ROS mais, pourquoi pas, par l'inhibition de l'oxydation de l'hème en hémine.

3.3.8. Rôle des cytokines inflammatoires (TNF- α ; TGF- β)

Des cytokines inflammatoires (TNF- α ; TGF- β) sont augmentées chez les patients β thalassémiques ce qui traduit un état inflammatoire chronique (systémique et/ou intra-osseux). Suivant les études, il semble que ces concentrations soient plus élevées uniquement chez des patients β -thalassémiques splénectomisés par rapport aux non-splénectomisés et à des contrôles sains. Cependant, comme on va le voir, les données de la littérature sont parfois contradictoires sur le sujet. Le rôle de la splénectomie dans l'augmentation de ces cytokines n'est pas univoque.

Ces cytokines pourraient jouer un rôle négatif sur l'érythropoïèse des β -thalassémies par analogie avec ce qui est décrit dans les anémies inflammatoires chroniques.

Plusieurs travaux montrent une augmentation de la concentration sérique de *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α) chez des patients β -thalassémiques majeurs. Cette augmentation serait, selon les études, associée (Chuncharunee, J. Med Assoc Thai 1997 ; Del Vecchio, Acta Haematol 2002 ; Gharagozloo, Ann. Hematol. 2009) ou non (Lombardi, Haematologica 1994 ; Meliconi, J. Clin. Pathol. 1992) aux antécédents de splénectomie. L'étude de Wanachiwanawin et col. effectuée chez des patients β -E thalassémiques ne précise pas le statut splénectomisé. Elle retrouve une concentration de TNF- α supérieure à la normale chez 33% des patients. (Wanachiwanawin, J Interferon Cytokine Res. 1999)

Ces auteurs suggèrent que la cause principale d'augmentation du TNF-α pourrait être l'activation macrophagique chronique, secondaire à la surcharge en fer et aux stimulations antigéniques, conséquences des transfusions régulières.

Le TNF- α inhibe l'érythropoïèse physiologique *in vitro* et *in vivo*. (Li, Exp. Hematol. 1989 ; Fukaya, Exp. Hematol. 2004 ; Xiao, Exp. Hematol. 2002) Cependant, le mécanisme précis de l'inhibition des progéniteurs érythroïdes n'est pas connu. Le TNF- α induit une augmentation d'apoptose des érythroblastes immatures. Il inhibe directement la pousse de colonies BFU-E (Li, Exp. Hematol. 1989 ; Fukaya, Exp. Hematol. 2004 ; Xiao, Exp. Hematol. 2004 ; Xiao, Exp. Hematol. 2002), alors que l'inhibition des colonies CFU-E est indirecte. Elle passe par l'induction de production d'Interféron- β (INF- β) par les cellules accessoires. (Means, J. Clin. Invest. 1993) Le TNF- α pourrait agir directement sur son récepteur (TNF-Récepteur) exprimé sur les érythroblastes immatures (cf chapitre 3.3.3. voies d'apoptose) ou par l'induction, via l'INF- β , de la

77

synthèse de céramide (lipide qui inhibe les colonies CFU-E). (Dallalio, Exp. Hematol. 1999) L'action inhibitrice du TNF-α sur la maturation érythroïde pourrait aussi passer par l'induction de NF-KB (Xiao, Exp. Hematol. 2002) et par l'inhibition de l'expression du complexe GATA-1/FOG-1. (Buck, Int. J. Oncol. 2009)

Deux études se sont intéressées à la concentration plasmatique de Transforming **Growth Factor-\beta1** (TGF- β 1) au cours de la β -thalassémie, chez l'enfant. Dans la première chez des enfants (a priori β-thalassémie intermédiaire mais le phénotype n'est pas renseigné dans l'article), les concentrations sont augmentées uniquement chez les splénectomisés par rapport aux non splénectomisés et à des enfants sains. (Moshtaghi-Kashanian, Cytokine 2006) Une autre étude chez des β -thalassémiques majeurs montre une concentration très diminuée par rapport à des enfants contrôles mais l'analyse selon le statut splénectomisé ou non n'a pas été faite. (Stritippayawan, Asian Pac. J. Allergy Immunol. 2005) Une dernière étude sur faible effectif ne semble pas non plus montrer d'augmentation sérique de TGF-β. (Pratelli, J. Pediatric Endocrinol. Metab. 2006) Comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, la concentration de GDF15, autre cytokine de la superfamille du TGF-β, est aussi très augmentée chez les patients β -thalassémiques. (Tanno, Nat. Med. 2007; Tanno, Blood 2009) Michaël Dussiot dans notre laboratoire a montré qu'il existait chez des patients β-thalassémiques majeurs une élévation sérique du GDF-11, faisant également partie de cette famille du TGF-B. Or, nous avons vu que le TGF-B1 est un inhibiteur de l'érythropoïèse car il agit en accélérant la différenciation ce qui se solde par une diminution de l'expansion cellulaire (puisqu'on laisse moins de temps à des cellules immatures de proliférer). (Zermati, Exp. Hematol. 2000) Le rôle physiopathologique de la famille du TGF- β dans la dysérythropoïèse des β thalassémiques n'avait pas été étudié jusqu'aux travaux de thèse de Michaël Dussiot chez la souris (article en révision). Nous verrons dans la partie discussion de cette thèse que nous avons aussi réalisé des expériences préliminaires dans l'érythropoïèse *in vitro* de patients β-thalassémiques majeurs qui semblent impliquer le TGF-β1 dans l'accélération de la différenciation. Le rôle de cette cytokine pourrait expliquer l'accélération de la différenciation érythroïde chez les patients.

Les résultats des études concernant d'autres cytokines inflammatoires dont le rôle physiopathologique est reconnu dans les anémies inflammatoires, (par exemple l'Interleukine-6) sont contradictoires avec parfois des augmentations de

78

concentration, (Chuncharunee, J. Med. Assoc. Thai. 1997 ; Aggelli, Int. J. Cardiol. 2005) parfois aucune différence par rapport aux contrôles. (Lombardi, Haematologica 1994)

3.3.9. Autres voies physiopathologiques impliquées dans l'érythropoïèse inefficace

3.3.9.1. Augmentation du nombre de macrophages et de leur activation

Comme nous l'avons vu, le nombre et l'activité des macrophages sont augmentés dans la moelle de patients β -thalassémiques. (Centis, Blood 2000; Angelucci, Haematologica 2002) Ces macrophages activés phagocytent sélectivement les érythroblastes apoptotiques qui expriment un signal de phagocytose (notamment par l'expression membranaire, sur les érythroblastes, de l'exposition à la surface de phosphatidyl sérine). (Angelucci, Haematologica 2002; Kuypers, Cell Mol. Biol. 2004; Knyszynski, Br. J. Haematol. 1979) Ainsi, des macrophages murins sains phagocytent deux fois plus d'érythroblastes provenant de la moelle de patients β -thalassémiques majeurs par rapport à ceux de moelles contrôles. (Angelucci, Haematologica 2002) Cette activation et cet excès macrophagique semblent donc contribuer à l'érythropoïèse inefficace comme vient de le démontrer Ramos et col. qui ont montré que le clodronate (bisphosphonate), en diminuant les macrophages modulait la prolifération et différenciation érythroïde dans des modèles de souris β -thalassémiques et sur des cultures cellulaires β -thalassémiques humaines *in vitro*. (Ramos, Nat Med 2013)

3.3.9.2. Réponse à l'érythropoïétine altérée

L'Epo est très augmentée en réponse à l'anémie chez les patients β -thalassémiques. (Ginzbourg, Blood 2011 ; Chen, J. Pediatr. Hematol. Oncol. 1998 ; Camaschella, Haematologica 1996) C'est d'ailleurs probablement la cause principale de l'expansion érythroblastique observée chez ces patients. (Ginzbourg, Blood 2011) JAK-2 est d'ailleurs fortement exprimé dans des érythroblastes murins et son blocage diminue l'expansion érythroblastique des souris β -thalassémiques. (Libani, Blood 2008) Cependant, cette augmentation réactionnelle d'Epo est altérée chez les patients β-thalassémiques si on la compare, à concentration d'hémoglobine égale, aux concentrations d'Epo chez des patients avec aplasie médullaire (Manor, Scand. J. Haematol. 1986 ; Cazzola, Blood 1998) ou carencés en fer. (Chen, J Pediatr Hematol Oncol 1998) Les mécanismes de cette plus faible concentration d'Epo que ne le voudrait le degré d'anémie, chez les patients thalassémiques, sont multiples :

 - clairance accrue de l'Epo secondaire à l'hyperplasie érythroïde. L'augmentation du nombre d'érythroblastes est responsable d'une augmentation de récepteurs à l'Epo qui vont internaliser l'Epo, avec pour conséquence une consommation accrue d'Epo (Camaschella, Haematologica 1996 ; Cazzola, Blood 1998),

- inhibition de la synthèse rénale d'Epo par des cytokines inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β , TGF- β ou TNF- α) (Faquin, Blood 1992) comme ce qui est décrit dans les anémies inflammatoires chroniques (Miller, N. Engl. J. Med. 1990), ou par une altération rénale à minima induite par l'hémoglobinopathie. En effet, des altérations néphrologiques, essentiellement tubulaires, sont décrites chez ces patients. (Aldudak, Pediatr. Nephrol. 2000 ; Smolkin, Pediatr. Nephrol. 2008)

3.3.9.3. Surcharge martiale

La surcharge martiale est la complication majeure des β -thalassémies. (Olivieri, N. Engl. J. Med. 1999) Les transfusions répétées expliquent facilement la surcharge en fer. Cependant des β -thalassémies intermédiaires peuvent aussi présenter une surcharge en dehors de toute transfusion. (Olivieri, N. Engl. J. Med. 1999 ; Pippard, Lancet 1979 ; Pootrakul, Blood 1988) Cela s'explique par une baisse de la sécrétion d'**hepcidine**. Cette hormone essentielle du métabolisme du fer bloque le relargage du fer par les macrophages et inhibe son absorption digestive. La synthèse hépatique d'hepcidine augmente en cas de stimulus inflammatoires et en réponse à la surcharge en fer. (Papanikolaou, Blood 2005) L'hepcidine devrait donc augmenter dans les β -thalassémies afin d'empêcher l'absorption digestive. C'est en fait l'inverse qui est observé chez les patients. (Papanikolaou, Blood 2005 ; Kattamis, Haematologica 2006) En effet, deux protéines de la famille du TGF- β , nommées growth differentiation factor 15 (GDF15) et twisted gastrulation protein homolog 1 (TWSG) (Tanno, Nat Med 2007 ; Tanno, Blood 2009) répriment la synthèse hépatique d'hepcidine. Les concentrations de ces deux protéines sont très élevées

dans le sérum de patients β -thalassémiques comparées à celles de contrôles sains. La répression de la synthèse d'hepcidine est due à la dysérythropoïèse. En effet, le GDF-15 est sécrété, au cours de la différenciation érythroïde terminale par les érythroblastes apoptotiques bien différenciés. Son expression est faible mais présente au cours de l'érythropoïèse physiologique. (Tanno, Curr. Opin. Hematol. 2010) De façon opposée, la synthèse de TWSG1 se fait dans les stades précoces de différenciation érythroblastique, avant l'hémoglobinisation. (Tanno, Blood 2009) L'excès de fer libre dans l'organisme est toxique pour la membrane des globules rouges des patients β -thalassémiques par l'oxydation qui en découle. Cela participe

à la production de ROS. Dans des modèles murins de β -thalassémie intermédiaire, Li et col. ont montré qu'en diminuant l'accès au fer des érythroblastes par des perfusions de transferrine, on limitait la formation d'agrégats de chaînes α toxiques ce qui améliorait l'érythropoïèse inefficace et l'anémie. (Li, Nat. Med. 2010)

L'effet néfaste du fer sur les membranes des globules rouges et peut-être sur l'oxydation dans les érythroblastes au cours de l'érythropoïèse inefficace pourrait être amélioré par l'utilisation de chélateur de fer pénétrant dans les érythrocytes comme la deferiprone (Shalev, Blood 1995) ou le deferasirox. (Forni, Haematologica 2013) Plusieurs communications au dernier congrès de l'ASH de 2012 faisaient état d'une amélioration de l'anémie chez des patients traités par ces chélateurs du fer.

Un autre mécanisme pourrait faire un lien entre surcharge martiale et érythropoïèse inefficace. En effet, la surcharge en fer chez les patients β -thalassémiques majeurs induit de nombreux problèmes endocriniens. Parmi eux, l'hypogonadisme, l'insuffisance corticotrope, l'hypothyroïdie pourraient contribuer à l'anémie centrale des patients. Cependant, ces troubles endocriniens sont le plus souvent correctement substitués, ce qui limite en pratique beaucoup la part de ces complications dans l'anémie des patients. (Tiosano, J. Endocrinol. Invest. 2001)

3.3.9.4. Déficit en acide folique

Un déficit en acide folique (et parfois même en vitamine B12) peut être observé chez les patients β-thalassémiques du fait d'une surutilisation des folates par l'hyperérythropoïèse. De ce fait, une supplémentation quotidienne en folate est recommandée. (Mazzone, Am. J. Hematol. 2001)

Q 1

Travail expérimental

HYPOTHESES ET OBJECTIF

Hsp70 est une chaperonne ubiquitaire dont le rôle principal est d'éviter que des protéines mal formées ou dénaturées ne s'agrègent et deviennent toxiques pour les cellules. Nous avons envisagé qu'Hsp70 pourrait jouer cette fonction au cours de l'érythropoïèse des β -thalassémies majeures en tentant de détoxifier les chaînes d' α -globine libres qui sont présentes en grand excès dans le cytoplasme des érythroblastes matures. Cette séquestration cytoplasmique d'Hsp70 par les chaînes d' α -globine aurait pour effet délétère l'absence de localisation nucléaire d'Hsp70 et en conséquence, la destruction de GATA-1 par la caspase-3 activée. Cela pourrait expliquer l'arrêt de maturation et la mort cellulaire au stade polychromatophile, deux caractéristiques de l'érythropoïèse inefficace des β -thalassémies majeures.

Cette hypothèse est résumée sur le schéma : en haut la physiopathologie telle qu'elle est considérée à ce jour, en bas, notre hypothèse passant par la séquestration cytoplasmique d'Hsp70.



RESULTATS

Nous présentons ici l'article soumis à *Nature* le 1^{er} mars 2013. Critiques des référés reçues le 20 mars 2013. Réponse attendue par l'éditeur dans les 6 mois. Expériences pour la révision, en cours Cytoplasmic sequestration of Hsp70 by excess of free α -globin promotes ineffective erythropoiesis in β -Thalassemia

Jean-Benoît Arlet^{1,2,4,5*}, Jean-Antoine Ribeil^{1,3,4,5*}, Adonis Hazoume^{6,7}, Samuel Demarest⁸, Isaure Chauvot de Beauchêne^{8,9}, Olivier Negre^{10,11}, Michaël Dussiot^{1,12}, Ivan Cruz Moura^{1,4,5,12,13}, Margaux Sevin^{6,7}, Thiago Trovati Maciel¹², Christian Auclair^{8,9}, Zakia Belaid-Choucair¹, Philippe Leboulch^{10,11}, Yves Beuzard^{10,11}, Véronique Baudin-Creuza^{5,14}, Michaela Fontenay¹⁵, Luba Tchertanov^{8,9}, Carmen Garrido^{6,7,16}, Olivier Hermine^{1,2,4,5,17*}, Geneviève Courtois^{1,4,5*}

Full institutional mailing addresses:

1 Laboratoire CNRS UMR 8147, « Equipe labellisée Ligue contre le Cancer », Hôpital Necker, Paris, France

- 2 Service de Médecine Interne, Faculté de médecine Paris Descartes, Sorbonne Paris-Cité et Assistance publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital européen Georges Pompidou, Paris, France
- 3 Département de Biothérapie, Faculté de médecine Paris Descartes, Sorbonne Paris-Cité et Assistance publique – hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Paris, France

4 Institut Imagine, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris-Cité et Assistance publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Paris, France

5 Laboratoire d'Excellence des Globules Rouges (GR-ex), Paris, France

6 INSERM, UMR 866, «Equipe labellisée Ligue contre le Cancer» and Laboratoire d'Excellence LipSTIC, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France;

7 University of Burgundy, Faculty of Medicine and Pharmacy, 21000 Dijon, France.

8 CNRS, UMR8113, Ecole Normale Supérieure de Cachan, 61 avenue du Président Wilson,94235 CEDEX Cachan, France

 9 Laboratoire d'Excellence en Recherche sur le Médicament et l'Innovation Thérapeutique (LERMIT), Campus Paris Saclay, France

10 CEA, Institute of Emerging Diseases and Innovative Therapies (iMETI), Fontenay-aux-Roses, France

11 Bluebird bio France, Fontenay-aux-Roses, France

12 INSERM U 699, Hôpital Bichat, Paris, France

13 Faculté de Médecine and Université Denis Diderot Paris VII, Paris, France

14 INSERM U779, Université Paris XI, Le Kremlin-Bicêtre, France

15 Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Université Paris Descartes, and Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpitaux Universitaires Paris Centre, Hôpital Cochin, Service d'hématologie biologique, 27 rue du Faubourg Saint-Jacques, Paris, France

16 CHU de Dijon, France

17 Service d'hématologie, Faculté de médecine Paris Descartes, Sorbonne Paris-Cité et Assistance publique-Hôpitaux de Paris Hôpital Necker, Paris, France

* These authors co-directed this work and contributed equally to this work

Address correspondence to:

Dr Geneviève Courtois PhD, Centre National de la Recherche Scientifique-Unité Mixte de Recherche 8147, Université Paris V. René Descartes, Hôpital Necker, 161 rue de Sèvres, 75743 Paris, France. Phone: 33-1-44490675; Fax: 33-1-4449-0676; e-mail: genevieve.courtois@parisdescartes.fr or to: Pr Olivier Hermine, M.D., Ph.D., Centre National de la Recherche Scientifique-Unité Mixte de Recherche 8147, Université Paris V. René Descartes, Hôpital Necker, 161 rue de Sèvres, 75743 Paris, France. Phone: 33-1-44490675; Fax: 33-1-4449-0676; e-mail: ohermine@gmail.com β -Thalassemia major (β -TM) is an inherited haemoglobinopathy caused by a quantitative defect in the synthesis of the β-globin chains of haemoglobin, leading to the accumulation of free α -globin chains that form toxic aggregates^{1,2}. Despite extensive knowledge on the molecular defects causing β-TM, little is known about the mechanisms responsible for ineffective erythropoiesis (IE), which is characterised by accelerated erythroid differentiation, maturation arrest and apoptosis at the polychromatophilic stage³⁻⁵. We have previously demonstrated that normal human erythroid cell maturation requires a transient activation of caspase-3⁶. Although GATA-1, the master transcriptional factor of erythropoiesis, is a caspase-3 target, we have shown that during human erythroid differentiation, it is protected from cleavage through its association with the chaperone heat shock protein 70 (Hsp70) in the nucleus⁷. Hsp70 is constitutively highly expressed in normal human erythroid cells⁷. The best-known role of this ubiquitous chaperone is to participate in proteins folding and refolding of proteins denatured by cytoplasmic stress, thus preventing their aggregation⁸. Here, we show that during the maturation of human β-TM erythroblasts, Hsp70 is sequestrated in the cytoplasm by the excess of free α -globin chains, resulting in nuclear GATA-1 cleavage and, in turn, end-stage maturation arrest and apoptosis. A molecular modelling shows that α -globin binds to a highly electronegative cavity formed by all Hsp70 domains. Additionally, the transduction of a nuclear-targeted Hsp70 mutant (Hsp70-S400A) or caspase-3 uncleavable GATA-1 mutant (μGATA-1) corrects β-thalassemia major IE in human cultured β-TM cells.

To investigate the hypothesis that Hsp70 can be sequestrated in the cytoplasm of mature β -TM erythroblasts by binding to free α -globin chains of haemoglobin or aggregates, we analysed its subcellular localisation in fresh bone marrow samples from adult TM patients (n=3) and healthy donors (n=3) by confocal microscopy. Erythroid maturation was evaluated by cell size and by α -globin staining intensity. We found that Hsp70 was mainly localised in the cytoplasm and that GATA-1 was poorly expressed in the nucleus of mature haemoglobinised erythroblasts from β -TM patients, in contrast to controls (Figure 1).



<u>Figure 1</u>: Hsp70 and GATA-1 expression in fresh bone marrow of β -thalassemia major patients (β -TM).

(A) Representative confocal microscopy analysis of α -globin, Hsp70 and GATA-1 expression in fresh bone marrow (BM) from 3 adult β -TM patients and 3 healthy donors. Scale bar, 5 μ m. Blue arrows indicate Hsp70 cytoplasmic sequestration into mature β -TM cell, and the white arrow shows immature cell. (B) Hsp70 cytoplasmic/nuclear mean fluorescence intensity (MFI) ratio (top) and GATA-1 nuclear MFI (bottom) of β -TM and controls. Bars indicate the median (IQR). p values were calculated using the Mann-Whitney *U*-test. **p<0.01. Next, to decipher the role of Hsp70 in ineffective erythropoiesis in β -TM, we performed an *in vitro* two-phase amplification liquid culture, allowing the proliferation, survival and erythroid differentiation of β -TM (n=16) or control CD34⁺ (n=8) progenitors towards the formation of acidophilic erythroblasts and reticulocytes. During the first phase of amplification, cell proliferation did not differ between thalassemic and control cells. In contrast, during the second phase, corresponding to erythroid terminal differentiation and maturation, at day 8, we observed, in β -TM, an accelerated differentiation characterised by a higher percentage of polychromatophilic cells (26.2% ±8.4 vs. 9.0% ±2.7; p=0,003) (Figure 2A), an accelerated down regulation of the early erythroid marker KIT/CD117 (mean fluorescence intensity (MFI) 25.7 ±17 vs. 115.1 ±47.1; p=0.0001) and an up regulation of GPA (MFI 243.8 ±87.8 vs. 178.9 ±56, p=0.04) (Supplemental Figure 1).



<u>Supplemental Figure 1.</u> The kinetics of differentiation of β -TM and control progenitors. CD36⁺ cells derived from CD34⁺ β -TM peripheral blood cells (n=16 independent experiments, 7 patients) or healthy peripheral blood cells (controls, n=8) were cultured with a two-phase amplification liquid culture system, as described. Day 0 of differentiation is the start of CD36⁺ cell culture, which represents the differentiation phase of our culture system. Differentiation staining was assessed daily by flow cytometry.

(A) Upper: differentiation curves assessed by Glycophorin A (GpA) mean fluorescence intensity (MFI). Lower: differentiation curves assessed by c-KIT/CD117 staining mean fluorescence intensity (MFI). The results are means (\pm SEM). p values compare β -TM and control-derived cells differentiated at day 8 and were calculated using t-tests. *p<0.05, ***p<0.001.

(B) One representative flow cytometry image of the stage of erythroid differentiation at day 8 of culture is shown for β -TM (upper panel) and control-derived cells (lower panel). GpA⁺/CD117⁻ cells represent mature erythroid cells.

At the time of intense haemoglobinisation (d8-d10), in β-TM cells, apoptosis was increased (at d10, $38.2\% \pm 15.1$ vs $18.5\% \pm 8.7$; p=0.01) (Figure 2B) and terminal maturation was arrested at the polychromatophilic stage. To quantify this maturation arrest, we defined an index of terminal maturation as the number of (acidophilic cells + reticulocytes per slide) \times 100 / number of polychromatophilic cells per slide. At day 8, this index was significantly decreased in β-TM cells, to 16% (IQR 8.8-27.8) compared to 37.6% in control cells (IQR 24.4-70.7; p=0.009) (Figure 2A). Taken together, our system of cell culture reproduced the characteristics of IE observed in β-TM, namely accelerated differentiation, maturation arrest and the death of mature haemoglobinised cells³⁻⁵. Next, we analysed the subcellular localisation of Hsp70 at several time intervals in β -TM patients (n=7) and healthy donors (n=7) by confocal microscopy. In agreement with what we observed in fresh primary bone marrow erythroblasts, Hsp70 was detected in the nucleus of control cells but was absent or only weakly expressed in mature haemoglobinised β -TM cells. Thus, at day 8, the ratio of cytosoplasmic/nuclear Hsp70 MFI in β-TM erythroblast cells was significantly increased, with a median ratio of 2.3 (IQR 1.6-3) compared to 1.1 in control cells (IQR 0.7-1.6; p<0.0001) (Figure 2C). As a result, GATA-1 was poorly expressed in the nucleus of mature haemoglobinised β -TM erythroblasts (Figure 2C), thus supporting our hypothesis. To further analyse and understand the link between haemoglobinisation, Hsp70 localisation and the decrease in GATA-1 expression, we studied the changes in the expression of these proteins during differentiation and maturation. We observed that in β -TM derived cells, the intensity of nuclear Hsp70 and GATA-1 staining decreased with erythroid differentiation and maturation, while these increased in controls (Figure 2D).



D







Figure 2

<u>Figure 2</u>: The characteristics of ineffective erythropoiesis in β -TM and the kinetics of Hsp70 and GATA-1 expression during *in vitro* erythroid differentiation.

CD36⁺ cells derived from CD34⁺ adult β -TM peripheral blood cells (n=16 independent experiments, 7 patients) or healthy peripheral blood cells (controls, n=8) were cultured with a two-phase amplification liquid culture system, as described in Methods section. Day 0 of differentiation is the start of CD36⁺ cell culture and represents the differentiation phase of our culture system.

(A) May-Grünwald-Giemsa staining at day 8. Left panel. A representative morphological analysis (×40) of erythroid differentiation is shown. Solid black arrows indicate reticulocytes, dashed blue arrows represent acidophilic cells, and dotted red arrows represent polychromatophilics cells. Upper middle panel: graph represents proportion of each erythroid stage in β -TM or control-derived cells. Proeryhtroblast (ProE) + basophilic (baso), polychromatophilics (Poly) cells and very mature cells-acidophilic cells (Acido) + reticulocytes (Retic) are expressed as a percentage of the total erythroid cells. Bars indicate the mean ± SEM for 14 independent experiments. p values were calculated using t-tests. **p<0.01; ***p<0.001. Lower middle panel: graph represents the terminal maturation index of β -TM and control-derived cells, as calculated by (acidophilic cells+reticulocytes per slide) × 100/ polychromatophilic cells per slide. The box and whiskers indicate the median-extremes. **p<0.01.

(B) Upper: apoptosis curves assessed daily by flow cytometry analysis of Annexin-V (AV) staining (mean percentage \pm SEM of AV positive, Propidium Iodide (PI) negative cells). Lower: differentiation curves assessed by benzidine staining. The results are the means of 17 independent experiments (mean percentage \pm SEM of positive cells).

(C) Left: representative confocal microscopy analysis of Hsp70, GATA-1 and α -globin at day 8. Right: Hsp70 cytoplasmic/nuclear MFI ratio and nuclear GATA-1 MFI of β -TM and control-derived cells. Bars indicate the median (IQR) of 15 independent experiments. p values were calculated using the Mann-Whitney *U*-test. ***p<0.001. The merged panel shows Hsp70 and α -globin co-localisation in the cytoplasm (yellow).

(D) Kinetics of Hsp70 and GATA-1 expression *in vitro*. Hsp70 cytoplasmic/nuclear MFI ratio and GATA-1 nuclear MFI were analysed at days 3, 5 and 8 of culture in 3 β -TM patients and 3 controls. Bars indicate the median (IQR). p values were calculated using the Mann-Whitney *U*-test. *p < 0.05, **p < 0.01; ***p < 0.001.

To demonstrate that Hsp70 could act as a molecular chaperone of free α -globin chains, we first analysed the subcellular localisation of both proteins by co-immunofluorescence experiments (n=7). From day 6 of culture, Hsp70 and α -globin were co-localised in the cytoplam of β -TM erythroblasts. Features of aggregates were sometimes observed in differentiated, haemoglobinised cells, with one typical picture shown in Figure 2C. Co-localisation was assessed using the average Pearson's correlation coefficient (PCC). At day 8, an apparent high level of co-localisation between Hsp70 and α -globin was detected, both in β -TM (PCC=0.4 ± 0.13) and in controls (PCC=0.31 ± 0.09). This finding was confirmed by Van Steensel's approach (data not shown). Similar findings were observed in fresh bone marrow experiments from patients and healthy donors (data not shown). To further characterise this co-localisation, we used a close *in situ* proximity ligation assay (Duolink[®]), which allows the identification of interacting proteins by fluorescent spots. At day 8, we detected spots in β -TM mature haemoglobinised cells (n=3) but much less so in controls. Additionally, cells containing abundant Hsp70/ α -globin complexes were apoptotic (Figure 3A).

Next, using a yeast two-hybrid system, we sought to provide additional evidence for the biochemical interaction of Hsp70 with the human α -globin chains. In our assays, the entire coding sequence of human Hsp70 was used as bait. Blue diploid transformants could be detected on a high stringency minimal medium, indicating a direct interaction between Hsp70 and the α -globin chains. Similar results were obtained when the β -globin coding sequence was used as prey, indicating that both the α - and β -globin chains could interact with Hsp70 (Figure 3B). To identify the Hsp70 domains involved in this interaction, we tested the binding of α -globin chains to deletion mutants of Hsp70 that expressed either the Nucleotide Binding Domain (NBD) or the Substrate Binding Domain (SBD) of Hsp70 (Figure 3B). Interestingly, neither of these two deletion mutants interacted with the α -globin chain, suggesting that the

entire structure of Hsp70 is required for the recognition of α -globin. To better characterise this interaction, we performed an *in silico* study involving molecular modelling, docking and molecular dynamics simulations. The α -globin was docked onto a homology-generated model of Hsp70¹⁻⁷⁰¹. We found that α -globin binds to a highly electronegative cavity formed by the NBD, SBD and lid (a C-terminal 10 kDa helical subdomain of the SBD) (Figure 3C). The resulting Hsp70¹⁻⁷⁰¹/ α -globin complex is stabilised by extensive protein-protein interactions mediated mainly by multiple hydrogen bonds engaging the three structural domains of Hsp70 (data not shown). Thus, the binding of α -globin to Hsp70 crucially modulates the chaperone structure and the interdomains interaction between NBD-lid and NBD-SBD.

Finally Hsp70/ α -globin complex was also evidenced by immunoprecipitation assays (supplemental Figure 3).



Figure 3

Figure 3 legend: Hsp70 and α-globin interaction.

(A) Duolink[®] *in situ* proximity ligation assay (PLA). Interactions were analysed at day 8 in CD36⁺ β -TM or control-derived cell cultures by PLA, according to the manufacturer's instructions using Hsp70 (1:200) and α -globin (1:200) antibodies. A FITC-conjugated Annexin-V antibody (1:200) was added at the end of the Duolink[®] assay. The red spots indicate close proximity (<40 nm) between cellular bound antibodies. A representative experiment is shown (n=3). Nuclei are stained with DAPI (blue), and Annexin-V staining is shown in green. Scale bar, 5 µm.

(B) Yeast two-hybrid assay detected, in upper panel, a direct interaction of α - and β -globin chains with Hsp70 (blue diploid yeast cells), but not, in lower panel, with the Hsp70 deletion mutants, Hsp70-Nucleotide Binding Domain (NBD) or Hsp70-Substrate Binding Domain (SBD). Each section contains diploid yeast cells resulting from an independent yeast mating experience with the corresponding bait protein and prey protein. The empty vectors, pGADT7 and pGBKT7, are used as negative controls. SV40 and p53 coding sequences are used as positive controls.

(C) Structural modelling of Hsp70 and the Hsp70¹⁻⁷⁰¹/ α -globin complex.

In the upper panel, from left to right, are the molecular surface and cartoon representation of the generated models of Hsp70, the Hsp70/ α -globin complex and their superimposition. The different Hsp70 domains are labelled and highlighted in colour. The lid is shown in red, the SBD is shown in green, the NBD is shown in blue, the hinge region between the NBD and the SBD is shown in violet, and α -globin is shown in yellow. The superimposed models are presented in transparent (Hsp70) and contrast (Hsp70/ α -globin complex) modes. The lid and SBD movements are shown by arrows. The haem group and ADP are shown by space-filling models.

In the lower panel, from left to right, are the electrostatic potential of the molecular surfaces of the Hsp70¹⁻⁷⁰¹/ α -globin complex, where Hsp70 and α -globin are shown in colour, from red (electronegative) through white (neutral) to blue (electropositive). The α -globin in the Hsp70¹⁻⁷⁰¹/ α -globin complex is shown in yellow for clarity. α -globin is rotated 180° respectively to its position in the Hsp70¹⁻⁷⁰¹/ α -globin complex, and its image is flipped horizontally to show the charge distribution on the surface interacting with Hsp70.

Altogether, our findings indicate that, in addition to Alpha Haemoglobin Stabilising Protein (AHSP), which stabilises the α -globin chains⁹, Hsp70 could act as a novel chaperone of α -globin chains. However, this apparent cytoprotective function of Hsp70 might be detrimental during stages of high haemoglobinisation and globin chain imbalance in β -TM by preventing the nuclear localisation of Hsp70 and, consequently, its function in protecting GATA-1 from cleavage by caspase-3.

To investigate the contribution of Hsp70 cytoplasmic sequestration to the pathophysiology of β -TM IE, we used lentiviral transduction to restore Hsp70 expression in the nucleus of β -TM erythroblasts. For this purpose, β -TM CD34⁺ cells (n=3) were transduced with lentiviruses expressing a nuclear-targeted Hsp70 mutant (Hsp70-S400A)¹⁰, wtHsp70, or an empty lentivector. As expected, at day 7 of the differentiation phase of culture, Hsp70-S400A (Figure 4A) and wtHsp70 (not shown) lentivectors increased nuclear Hsp70 localisation and rescued GATA-1 expression in β-TM erythroid cells. The restoration of nuclear Hsp70 localisation efficiently improved the terminal maturation of β -TM erythroblasts. At day 7, in Hsp70-S400A transduced β-TM erythroblasts, the percentage of mature cells (acidophilic cells and reticulocytes) was increased when compared to the empty vector control (10.6 $\pm 3.2\%$ vs 1.1 $\pm 0.7\%$, p=0.01 Figure 4B). Similarly, the terminal maturation index was increased (28.1% (IQR 28.1-51.3) vs 4.6% (IQR 1.7-6.7); p=0.01). In addition, rescuing nuclear Hsp70 localisation induced a dramatic two-fold decrease in apoptosis (9.9 ±2.8% vs $20.7 \pm 5.6\%$; p<0.001) (Figure 4C). Next, to analyse the consequences of GATA-1 cleavage on the maturation arrest and apoptosis observed in cultured β -TM erythroblasts, we transduced β -TM CD34⁺ cells with a GATA-1 mutant that was uncleavable by caspase-3 $(\mu GATA-1)^{11}$ or a GFP⁺ empty vector. The $\mu GATA-1$ mutant had a positive effect on erythroid terminal maturation that was similar to that of Hsp70-S400A (Figure 4A-D). Conversely, apoptosis was not corrected indicating that cleavage of GATA-1 contributes to

impair the erythroid maturation but to a less extent to apoptosis of β -TM cells, as previously reported in low grade myelodysplastic syndromes¹⁰.

Foetal haemoglobin (HbF, $\alpha_2\gamma_2$), which is replaced after birth by the adult haemoglobin (HbA, $\alpha_2\beta_2$), is concentrated in a few F cells and represents less than 1% of the haemoglobin content in healthy adults¹². In β -TM patients, there is an elevation in the proportion of F cells to compensate for the lack of β -chain synthesis, and the only surviving mature erythroblasts are F cells. GATA-1 has a major role in regulating the haemoglobin gene expression; it is sometimes described as a transcription repressor or activator of the human γ -globin chains gene¹⁴⁻¹⁶. As such, we studied the effect of GATA-1 nuclear restoration on HbF expression by flow cytometry. At day 7, we observed that while the number of F cells decreased with maturation (data not shown and ¹⁷), the percentage of HbF^{high} cells, as assessed by flow cytometry, was significantly increased concomitantly with the protection of GATA-1 by Hsp70-S400A (54.8% ±12 vs 45.9% ±10.5; p<0.004) (n=3) and in μ GATA-1 transduced erythroblasts (51.4±8.2% vs 40.5±9.4 %; p<0.002) (n=3) (Figure 4D).



Figure 4

<u>Figure 4 legend</u>: The transduction of a nuclear Hsp70 mutant (Hsp70-S400A) or a caspase-resistant GATA-1 mutant (μ GATA-1) rescues cell terminal maturation and cell survival in β -thalassemia major (β -TM).

 β -TM CD34⁺ cells were transduced with a nuclear-targeted Hsp70 lentiviral mutant (Hsp70-S400A), a retroviral mutant of GATA-1 uncleavable by activated caspase-3 (μ GATA-1), and their appropriate empty vectors as controls and were cultured as described in the methods. CD36⁺/GFP⁺ cells were then purified, cultured, and differentiated in Epo-containing medium. All data presented here were analysed at day 7 of the CD36⁺ culture.

(A) A confocal microscopy image of Hsp70 and GATA-1 is shown in the left panel. The image is representative of three experiments. Graphs in the right panel represent the nuclear mean fluorescence intensity (MFI) of Hsp70 and GATA-1 (\pm 95% CI) in transduced and control cells (top panel: Hsp70-S400A transduced cells; bottom panel: μ GATA-1 transducted cells) (20 cells were analysed in three different fields/slide, n=3 patients). Scale bar, 5 μ m. p values were calculated using Mann-Whitney *U*-test. ****p*<0.001.

(B) May-Grünwald-Giemsa (MGG) staining at day 7. Left panel: Graphs represent proportion of each erythroid stage in transduced and control β -TM cells (upper panel, Hsp70-S400A; lower panel, μ GATA-1). Proerythroblast (ProE) + basophilic (baso), polychromatophilics (Poly) cells and very mature cells-acidophilic cells (Acido) + reticulocytes (Retic) are expressed as a percentage of the total erythroid cells. Bars indicate the mean ± SEM for 3 independent experiments. p values were calculated using t-tests. Right panel: one representative morphological analysis of the erythroid differentiation for each transduction (n=3) is shown (×100). Solid black arrows indicate polychromatophilic cells.

(C) Apoptosis in the GFP^+ /propidium iodide⁻ cell population was assessed by Annexin V binding by flow cytometry. A representative experiment of each transduction is shown (n=3 patients/transduction).

(D) The percentage of HbF^{high} cells was assessed by flow cytometry on mature cells (GFP⁺ and low forward light scatter-FSC). A representative experiment of each transduction is shown (n=3 patients/infection).

Finally, to ensure the specificity of our findings, we lentivirally transduced β -TM CD34⁺ cells with the β -globin gene and found that this led to Hsp70 nuclear re-localisation, GATA-1 protection (Suppl Figure 2), and the restoration of normal erythroid maturation (not shown).



<u>Supplemental Figure 2</u>. The lentiviral transduction of β -TM CD34⁺ cells with the β -globin gene rescues Hsp70 nuclear localisation and GATA-1 protection.

 β -TM CD34⁺ cells derived from peripheral blood cells were infected with a lentivirus encoding the β -globin gene or a control virus. They were then cultured with a two-phase amplification liquid culture system, as described. Confocal microscopy analysis at day 8 of the CD36⁺ cell culture shows Hsp70 nuclear localisation and GATA-1 expression in β -globin gene transduced cells (top) and control transduced cells (bottom). Scale bar, 10 μ m.

Conclusion:

Taken together, our data demonstrate that the cytoplasmic sequestration of α -globin chains by Hsp70 prevents their nuclear localisation. This is a key mechanism inducing the IE observed in β -TM patients. Our modelling studies suggest that Hsp70 could have been selected during evolution to serve as a specific chaperone of globin chains to protect early erythroblasts during erythroid differentiation.

Our structural model of the Hsp70¹⁻⁷⁰¹/ α -globin complex provides a new rationale for a targeted therapy in β -thalassemia major IE. Small compounds disrupting the Hsp70/ α -globin complex in the cytoplasm may increase the nuclear localisation of Hsp70 and may thus reduce maturation arrest and increase the number of F cells. Ultimately, these outcomes may decrease the patients' requirement for a blood transfusion and the associated complications, including iron overload.

Methods Summary

Erythroid cells were generated *in vitro* from the peripheral blood circulating CD34⁺ cells from 7 adult patients with β^0 -TM or 8 healthy donors. Fresh normal bone marrow cell smears were obtained from 3 adult patients with β^0 -TM who had undergone cholecystectomy or splenectomy, or 3 healthy controls (allogenic bone marrow donors), after they had given written informed consent. This study was performed according to the Helsinki Declaration with the approval from the ethics committee of our institution. Erythroid cells in culture were generated as previously described^{6,7}. Details of the reagents and protocols for cell proliferation and differentiation analysis, confocal fluorescence microscopy analysis, molecular modelling, docking and molecular simulations, yeast-two hybrid assays, the production of lentiviral particles and the transduction of haematopoietic progenitors, and the generation of Hsp70 and GATA-1 mutants are provided in the Supplementary Methods. Statistical analyses were performed using GraphPad PrismTM software. Data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) or median (interquartile range-IQR), unless noted otherwise. Student's paired t-test or Mann-Whitney U-test was used as appropriate. * *p value* <0.05, ** *p value* <0.01, *** *p value* <0.001

REFERENCES

- Khandros, E. & Weiss, M. J. Protein Quality Control During Erythropoiesis and Hemoglobin Synthesis. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 24, 1071– 1088 (2010).
- Ginzburg, Y. & Rivella, S. β-thalassemia: a model for elucidating the dynamic regulation of ineffective erythropoiesis and iron metabolism. *Blood* 118, 4321–4330 (2011).
- 3. Yuan, J. *et al.* Accelerated programmed cell death (apoptosis) in erythroid precursors of patients with severe beta-thalassemia (Cooley's anemia). *Blood* **82**, 374–377 (1993).

- 4. Mathias, L. A. *et al.* Ineffective erythropoiesis in β-thalassemia major is due to apoptosis at the polychromatophilic normoblast stage. *Experimental Hematology* **28**, 1343–1353 (2000).
- 5. Centis, F. *et al.* The importance of erythroid expansion in determining the extent of apoptosis in erythroid precursors in patients with β -thalassemia major. *Blood* **96**, 3624–3629 (2000).
- 6. Zermati, Y. *et al.* Caspase Activation Is Required for Terminal Erythroid Differentiation. *J Exp Med* **193**, 247–254 (2001).
- 7. Ribeil, J.-A. *et al.* Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* **445**, 102–105 (2007).
- 8. Hartl, F. U., Bracher, A. & Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **475**, 324–332 (2011).
- 9. Kihm, A. J. et al. An abundant erythroid protein that stabilizes free alphahaemoglobin. *Nature* **417**, 758–763 (2002).
- 10. Frisan, E. *et al.* Defective nuclear localization of Hsp70 is associated with dyserythropoiesis and GATA-1 cleavage in myelodysplastic syndromes. *Blood* **119**, 1532–1542 (2012).
- 11. De Maria, R. *et al.* Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* **401**, 489–493 (1999).
- 12. Dover, G. J. & Boyer, S. H. Fetal hemoglobin-containing cells have the same mean corpuscular hemoglobin as cells without fetal hemoglobin: a reciprocal relationship between gamma- and beta-globin gene expression in normal subjects and in those with high fetal hemoglobin production. *Blood* **69**, 1109–1113 (1987).
- 13. Yao, X. et al. Role of STAT3 and GATA-1 interactions in gamma-globin gene expression. Exp. Hematol. 37, 889–900 (2009).
- 14. Woon Kim, Y., Kim, S., Geun Kim, C. & Kim, A. The distinctive roles of erythroid specific activator GATA-1 and NF-E2 in transcription of the human fetal γ-globin genes. *Nucleic Acids Res* **39**, 6944–6955 (2011).
- 15. Zhu, J. *et al.* Recombinant erythroid Kruppel-like factor fused to GATA1 upregulates delta- and gamma-globin expression in erythroid cells. *Blood* **117**, 3045–3052 (2011).
- 16. Sankaran, V. G. & Orkin, S. H. The Switch from Fetal to Adult Hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**, (2013).
- 17. Bhanu, N. V. *et al.* A sustained and pancellular reversal of gamma-globin gene silencing in adult human erythroid precursor cells. *Blood* **105**, 387–393 (2005).

Zermati, Y. *et al.* Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors. *Exp. Hematol.* 28, 885–894 (2000).

Acknowledgments

Dr Jean-Benoît Arlet was a recipient of grants from the Société Nationale Française de Médecine Interne (SNFMI), Société Française d'Hématologie (SFH), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP) (poste d'accueil APHP-CNRS), and from Groupe Pasteur mutualité. S Demarest was a recipient of funding from Institut FARMAN (ENS de Cachan). I. Chauvot de Beauchêne was a recipient of a PhD scholarship fund from ENS de Cachan. A. Hazoume was a recipient of a post-doctoral grant from the Conseil Régional de Bourgogne and M. Sevin from l'Institut National du Cancer, INCa.

This work is supported by Agence Nationale pour la Recherche (ANR), Ligue nationale contre le cancer, Fondation pour la recherche médicale, (FRM), Fondation de France.

We would also like to thank N. Goudin and R. Desvaux from the Plateforme d'imagerie cellulaire de l'IFR94, Faculté de Médecine Nécker (Paris, France) for experimental help in image acquisition and analysis on confocal microscopy and the Department of Biotherapy at the Nécker Hospital (Paris, France) for providing blood samples. We thank E. Frisan from the Department of Haematology and INSERM U1016, Hôpital Cochin, Paris for the gift of Hsp-S400A mutant. We thank Dr U. Testa, A. Zeuner, and R. de Maria from the Department of Haematology and Oncology, Instituto Superiore di Santia, Rome, Italy, for the gift of cDNAs of GATA-1.

Author contributions

J-B.A. designed and performed all experiments, analysed the data and wrote the manuscript. J-A.R. designed the study, supervised the overall project, analysed the data, provided human samples and helped to write the manuscript. A.H., M.S., C.G. and V.B-C. performed the yeast two-hybrid assays, analysed the data and helped to write the manuscript. S.D., I. C..B, L.T. and C.A. performed the molecular modelling, docking and molecular simulations, and helped to write the manuscript. M.D., I.C.M. and T.T.M. analysed the data and helped to write the manuscript. O.N, P.L. and Y.B. performed the β -globin gene lentiviral transduction. O.H. designed the study, supervised the overall project, analysed the data and wrote the manuscript. G.C. performed experiments, supervised the overall project, analysed the data and wrote the manuscript.

Author information

Information regarding reprints and permissions is available at <u>www.nature.com/reprints</u> All authors declare no competing financial interest for this work.

Correspondence and requests for materials should be addressed to jeanbenoit.arlet@egp.aphp.fr
Additional Online Methods

Erythroid liquid culture

The circulating peripheral blood of β -TM patients contains a small number of hematopoietic progenitor cells¹⁹. Erythroid cells were also generated *in vitro* from peripheral blood circulating CD34⁺ cells from adult patients with β^0 thalassemia major (β -TM), which were collected before routine transfusion, or from control patients who were healthy donors treated with G-CSF to induce hematopoietic stem cell mobilisation.

This study was done according to the Helsinki Declaration with the approval from the ethics committee of our institution (Comité de Protection des personnes (CPP) "Ile de France II"). All patients gave written informed consent. In the first step of culture ("cell expansion"), isolated CD34⁺ progenitors (Miltenyi CD34 Progenitor Cell Isolation Kit) were grown in the presence of 100 ng/ml IL-6, 10 ng/ml IL-3 and 100 ng/ml SCF for 7 days. At day 7, CD36⁺ erythroid progenitors were isolated by magnetic isolation (Miltenyi Biotec). In the second phase of culture, which allows the "differentiation and maturation of erythroblasts", CD36⁺ cells were cultured in the presence of 10 ng/ml IL-3, 100 ng/ml SCF and 2 U/ml Epo in IMDM (Gibco cell culture) supplemented with 15% BIT 9500 (Stem Cell Technologies), as previously described^{6,7}.

Apoptosis assay and cell differentiation

Apoptosis was assessed by Annexin V binding and propidium iodide (PI) staining (ebioscience). Early apoptotic cells were defined as Annexin-V positive and PI negative.

Differentiation was assessed by various methods. First, morphological analysis after May-Grünwald-Giemsa (MGG) staining was used. Cells were examined under a Leica DMRB microscope with a PLFluotar $40\times$ oil objective in a blinded fashion. The number of proerythroblasts, basophilic, polychromatic, acidophilic erythroblasts and reticulocytes was

assessed in each experiment by counting approximately 300 cells in consecutive oil immersion fields and expressed as a percentage of total cells. Additionally, differentiation was assessed by calculating a terminal maturation index on MGG, defined by the number of acidophils+reticulocytes per slide ×100/ number of polychromatophilic cells per slide. This allowed us to better characterise the maturation arrest at the polychromatophilic stage, which is known to be a hallmark of ineffective erythropoiesis⁴, and its modulation. We also measured the haemoglobin content, as assessed by benzidine staining. Flow cytometry analysis was also performed each day after double labelling with a phycoerythrin (PE)-conjugated anti-GPA (BD Pharmingen) antibody and an APC-conjugated anti-CD117 (c-kit) (e-bioscience) antibody. The percentage of GPA⁺/CD117⁻ cells represented mature erythroid cells²⁰.

F cells were evidenced by flow cytometry analysis. The cultured cells were fixed and permeabilised, washed with 1X PBS/1% BSA and then stained with PE-conjugated antihuman haemoglobin F (HbF) (BD Pharmingen) for 30 min at room temperature. The cells were then analysed with a FACSCaliburTM (Becton Dickinson).

Analysis of the Hsp70/alpha-globin complex

• Yeast two-hybrid assay

The bait vector used was pGBKT7, and the prey vector was pGADT7 (Clontech). The human α - and β -globin coding sequences were cloned into the *EcoRI/BamHI* and *NdeI/ClaI* sites, respectively, of the pGADT7. The coding sequence of the human Heat Shock Protein 70 (Hsp70) was cloned into the *EcoRI/Bam*HI sites of the pGBKT7. An N-terminal nucleotide binding-domain (NBD) (residues 1-380) and a C-terminal substrate binding-domain (SBD) (residues 394-615) were cloned in pGBKT7. The pGBKT7-p53 plasmid was used as a

positive bait control. This plasmid encodes the GAL4 DNA-BD fused with murine p53. As a positive control prey plasmid, pGADT7-SV40, which encodes the GAL4 activation domain fused with SV40 large T-antigen, was used. The empty vector, pGADT7, was used as a negative control prey plasmid. All pGADT7- and pGBKT7-derived vectors were transformed into Y187 and Y2HGold yeast strains, respectively (Clontech Yeastmaker Yeast Transformation System 2). After growth at 30°C for 3 to 5 days, the transformants were selected on Leu_ and Trp_ minimal media plates, respectively. Each prey strain was mated with the bait strain to generate diploid yeast cells (Clontech Matchmaker Gold Yeast 2-Hybrid system). Diploid yeast cells selected on Leu_Trp_ minimal media plates with X- α -Galactosidase (40 µg/mL) and Aureobasidin A (70 ng/mL). Blue diploid cells appeared after 3 to 5 days at 30°C, indicating the interaction between the bait and the prey proteins. To confirm these results, the diploid yeast cells were then patched onto higher stringency His_Ade_Leu_Trp_ minimal media plates and 70 ng/mL Aureobasidin A.

• Confocal analysis

Cell permeabilisation and labelling for fluorescence microscopy:

The cells were washed, spun onto slides, fixed with acetone, hydrated with cold 1X PBS/1% BSA for 30 minutes, treated with formaldehyde (Sigma) for 15 minutes, and then with methanol (Prolabo) for 10 minutes at room temperature. Next, the cells were permeabilised with 1X PBS/0.2% Triton X100 (Sigma) for 10 minutes at 4°C, washed with 1X PBS/1% BSA and incubated in 3% BSA for 30 min. They were then sequentially incubated with the antibodies as follows: anti-GATA-1 overnight at 4°C, anti-rat-Cy3 for 45 minutes at room temperature, rabbit anti-Hsp70 or anti-caspase-3 for 1 hour at room temperature, anti-rabbit Alexa 647 for 45 minutes at room temperature and anti-haemoglobin-FITC (Abcam) for 60

minutes at room temperature. All antibodies were diluted in 1X PBS/1% BSA/0.1% Tween (Sigma). Nuclei were stained with DAPI, and the slides were examined with a confocal laser microscope (LSM 510 Carl Zeiss).

Fresh, normal, bone-marrow cell smears were fixed with acetone. Permeabilisation and labelling with anti-GATA-1, anti-Hsp70 and anti- α globin antibodies were performed as above.

To more precisely analyse the Hsp70/ α -globin interaction, we used the Duolink[®] II technology (Olink[®] Bioscience), which is an *in situ* proximity ligation assay technology. In this assay, a pair of secondary antibodies labelled with oligonucleotides (PLA probes) only generates a signal when the two probes are bound in close proximity (< 40 nm). The signal from each detected pair of PLA probes is visualised as an individual fluorescent spot²¹. Slides were incubated with primary antibodies as described above and with secondary antibodies conjugated with oligonucleotides (PLA probe MINUS anti-mouse and PLA probe PLUS anti-rabbit). Ligation and amplification reactions were performed according to the manufacturer's instructions.

• Molecular modelling, docking and molecular dynamics (MD) simulations

All calculations were carried out on a PC station and on the Meso Center of ENS de Cachan running Linux CentOs 5.2. Figures were produced with the PyMOL molecular graphics system²², and R was used for statistical computing²³. The template structures for homology modelling were retrieved from the Protein Data Bank (PDB)²⁴.

Molecular modelling

<u>- Hsp70</u>: The 3D model of the full-length human Hsp70¹⁻⁷⁰¹ was generated from partial structures (X-ray or RMN) by homology modelling of the separate Hsp70 domains and molecular complex Hsp110•Hsp70 (PDB codes: 3C7N ²⁵, 2QWL ²⁶, 3FE1 ²⁷ and 2LMG ²⁸).

The sequence of $Hsp70^{1-701}$ was aligned to the template sequences with $ClustalW^{29}$ and $Modeller^{30}$. The interdomain linkers were constructed by *ab-initio* loop generation using Modeler.

<u>- α -globin</u>: The initial structural data of α -globin was taken from the X-ray structure (PDB code: 3S66³¹) and was docked onto the generated model of Hsp70¹⁻⁻⁷⁰¹ using three algorithms: Zdock³², FlexDock³³ and HingeProt³⁴. The minimised structure (CHARMM)³⁵ of the Hsp70¹⁻⁷⁰¹/ α -globin complex was analysed for hydrophobic and electrostatic complementarities and H-bond interactions on the interface of the proteins. The ADP-Mg²⁺ and Haem Fe²⁺ were incorporated into proteins.

Molecular Dynamics (MD) simulations

Molecular Dynamics (MD) simulations were performed using GROMACS 4.5.4 ³⁶ with CHARMM 27 force field. Each generated model, Hsp70 or the Hsp70¹⁻⁷⁰¹/ α -globin complex, was solvated in a TIP3P water box with a minimum distance of 15 Å from the edge of the box to any protein atom. The charges of the system were neutralised by adding counterions (Na⁺ or Cl⁻). The solvated systems were first minimised for 1,000 steps with the protein atoms restrained, followed by another 3,000 steps of minimisation with all atoms allowed to move. The temperature of each system was then increased to 300 K by increments of 0.001 K during 2 ps. The system was further equilibrated under constant volume and temperature (NRT) conditions for 100 ps constraining protein backbone atoms, followed by 500 ps equilibration without constraints under constant pressure and temperature (NPT) at 300 K and 1 bar. Production simulations were performed for 20 ns in the NPT ensemble. Short-range interactions employed a switch function with a 12 Å cut-off and a 10 Å switch distance, and the long-range electrostatic interactions were calculated with the Particle Mesh Ewald

protocol³⁷. During production simulations, the time step was 2 fs, with a SHAKE constraint on all bonds containing hydrogen atoms.

• Viral transduction

Lentiviral production

The nucleus-targeted Hsp70 mutant (Hsp70-S400A) was cloned in the pTrip_U3EF1 lentiviral vector upstream of an IRESECMV–Green Fluorescent Protein (GFP) cassette. Infectious vector particles were produced in 293T cells by cotransfection of the vector with the encapsidation plasmid psPAX2 and the expression plasmid pHCMV-G, using the jetPRIMETM transfection reagent (Polyplus). Supernatants were collected 48 hours and 72 hours after transfection and were pooled and concentrated by ultracentrifugation. Virus stocks were kept frozen at -80°C.

For the lentivirus production of the β -globin gene, vesicular stomatitis virus glycoprotein pseudotyped lentiviral supernatant was produced by transient transfection of HEK293T cells with the 5-plasmid system (LentiGlobin construct, HPV 275-gag-pol plasmid, Ψ N 15-vsvG env plasmid, p633-rev plasmid, HPV601-tat plasmid) by calcium phosphate coprecipitation in Dulbecco's modified Eagle's media supplemented with 5% foetal bovine serum (Invitrogen), followed by harvest in CellGro SCGM serum-free media (CellGenix) after 48 h. Concentrated virus was then frozen and stored at -80°C.

Retroviral production

Uncleavable mutant GATA-1 (μ GATA-1) was cloned in PINCO vector upstream of a CMV promoter-Green Fluorescent Protein (GFP) cassette, which was a generous gift from R. De Maria Rome, Italy. These were used to produce vector particles by cotransfection of 293EBNA cells with the vector plasmid, an encapsidation plasmid (gag-pol) lacking all

accessory HIV-1 proteins, and an expression plasmid (pHCMV-G) encoding the vesicular stomatitis virus (VSVg) envelope, using jetPRIME TM transfection reagent.

Infection of erythroid cells

<u>Hsp70-S400A and μ GATA-1 transduction</u>: CD34⁺ cells isolated from β-TM peripheral blood mononuclear cells were cultured for 5 days, as described above. They were then infected by lentiviruses or retroviruses, in the presence of 4 µg/mL protamine sulphate. A second round of infection was performed 24 hours later, upon changing to fresh medium with cytokines. After an additional 24 hours, cells were extensively washed in PBS and stained with the anti-CD36-APC mAb (BD Pharmingen). The CD36⁺/GFP⁺ cell population was purified by cell sorting and cultured for 7 to 10 additional days in serum-free medium in the presence of IL3+SCF+EPO, as described above.

<u>β-globin gene lentivirus transduction</u>: CD34⁺ cells were isolated from β-TM peripheral blood mononuclear cells by magnetic sorting (Miltenyi Biotec). Sorted cells were prestimulated for 24 h in CellGro SCGM media supplemented with 100 ng/mL hSCF, 100 ng/mL hTPO, 100 ng/mL hFlt3L and 60 ng/mL hIL-3 at 37°C and 5% CO₂. Then, prestimulated cells were transduced for 22 h with the LentiGlobin vector at an MOI of 50 in CellGro SCGM media supplemented with 100 ng/mL hSCF, 100 ng/mL hTPO, 100 ng/mL hFlt3L, 60 ng/mL hIL-3 and 4 µg/mL protamine sulphate, or mock transduced in the same conditions. Two-phase liquid culture was then performed as described above.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with GraphPad PrismTM (version 5.0; GraphPad Software). The data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) or median (interquartile range-IQR), unless noted otherwise. Student's paired *t*-test or Mann-Whitney *U*-test was used as appropriate. **p* value <0.05, ***p* value <0.01, ****p* value <0.001

Supplementary references related to additional Methods section

- 19. De Franceschi, L. *et al.* K-CL co-transport plays an important role in normal and beta thalassemic erythropoiesis. *Haematologica* **92**, 1319–1326 (2007).
- 20. Gabet, A.-S. *et al.* Caspase-activated ROCK-1 allows erythroblast terminal maturation independently of cytokine-induced Rho signaling. *Cell Death Differ*. **18**, 678–689 (2011).
- 21. Schallmeiner, E. *et al.* Sensitive protein detection via triple-binder proximity ligation assays. *Nat. Methods* **4**, 135–137 (2007).
- 22. DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System (2002). http://www.pymol/org
- 23. R Development Core Team R: A language and environment for statistical computing. (2011). http://www.R-project.org/
- 24. Berman, H. M. *et al.* The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics. *Nat. Struct. Biol.* **7** Suppl, 957–959 (2000).
- 25. Sousa, R. & Lafer, E. M. Keep the traffic moving: mechanism of the Hsp70 motor. *Traffic* 7, 1596–1603 (2006).
- 26. Jiang, J. *et al.* Structural basis of J cochaperone binding and regulation of Hsp70. *Mol. Cell* **28**, 422–433 (2007).
- 27. Wisniewska, M. *et al.* Crystal structures of the ATPase domains of four human Hsp70 isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B', and HSPA5/BiP/GRP78. *PLoS ONE* **5**, e8625 (2010).
- 28. Gao, X.-C. *et al.* The C-terminal helices of heat shock protein 70 are essential for J-domain binding and ATPase activation. *J. Biol. Chem.* **287**, 6044–6052 (2012).
- 29. Larkin, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23, 2947–2948 (2007).
- 30. Eswar, N. *et al.* Tools for comparative protein structure modeling and analysis. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3375–3380 (2003).
- Shibayama, N., Sugiyama, K. & Park, S.-Y. Structures and oxygen affinities of crystalline human hemoglobin C (β6 Glu->Lys) in the R and R2 quaternary structures. J. Biol. Chem. 286, 33661–33668 (2011).
- 32. Chen, R., Li, L. & Weng, Z. ZDOCK: an initial-stage protein-docking algorithm. *Proteins* **52**, 80–87 (2003).
- 33. Mashiach, E. et al. An integrated suite of fast docking algorithms. Proteins 78, 3197–3204 (2010).
- 34. Emekli, U., Schneidman-Duhovny, D., Wolfson, H. J., Nussinov, R. & Haliloglu, T. HingeProt: automated prediction of hinges in protein structures. *Proteins* **70**, 1219–1227 (2008).
- 35. Brooks, B. R. *et al.* CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem* **30**, 1545–1614 (2009).
- 36. Van Der Spoel, D. et al. GROMACS: fast, flexible, and free. J Comput Chem 26, 1701–1718 (2005).
- 37. Batcho PF, Case DA & Schlick T Optimized particle-mesh Ewald/multiple-time step integration for molecular dynamics simulations. *Journal of chemical physics* **115**, 4003–4018 (2001).



Figure Supplemental 3:

Immunoprecipitation (IP) assay of Hsp70 and α -globin from whole cell lysates derived from erythroid cells at day 8 of CD36⁺ cells cultures derived from two adults β -TM patients (Thal 1 and 2) and one healthy adult PBSC (peripheral blood stem cells). Hsp70-containing proteins were immunoprecipited with the anti-Hsp70 monoclonal antibody (Hsp70-Ab) or control antibody (Ctl-Ab) and then immunoblotted (IB) using an anti- α -globin antibody (lower panel). IB with anti-Hsp70 polyclonal antibody (upper panel) was showed as a control. Hsp70 Ab co-precipited α -globin in TM erythroid cells, while the control antibody (that does not bind Hsp70) did not.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Analyse critique des résultats

Dans ce travail, nous avons démontré, grâce à des expériences de double hybride en levure, qu'Hsp70 se liait directement aux chaînes d'α-globine libres (expression d'α-globine sans hème dans ces levures). *In vivo*, en pathologie, Hsp70 co-localise avec les chaînes d'α-globine dans le cytoplasme d'érythroblastes matures de moelle osseuse de patients β-thalassémiques, ce que nous avons démontré aussi in vitro dans des érythroblastes en culture. Enfin, nous avons montré par immunoprécipitation d'Hsp70 révélée par l'α-globine (figure supplémentaire 3) que le contenu cytoplasmique d'érythroblastes matures β-thalassémiques en culture contenait les deux protéines complexées.

Cette fonction apparemment cytoprotectrice d'Hsp70 devient très délétère lorsque la concentration d'a-globine dépasse les capacités du système, ce qui est le cas au stade d'érythroblaste polychromatophile dans les β -thalassémies majeures, cellule dans laquelle la concentration en hémoglobine augmente le plus fortement. En effet, la séquestration d'Hsp70 par l'a-globine empêche alors sa translocation nucléaire ce qui empêche la protection de GATA-1 du clivage par la caspase-3 activée. Il s'ensuit un arrêt de maturation et une mort par apoptose.

Cette séquestration cytoplasmique d'Hsp70 et la dégradation consécutive de GATA-1 semble donc être le grand mécanisme de deux des trois composantes de l'érythropoïèse inefficace : arrêt de maturation et apoptose. En effet, l'hyperexpression globale d'Hsp70 par le mutant Hsp-WT ou l'hyperexpression nucléaire par le mutant Hsp-S400A dans les érythroblastes corrigent ces deux aspects de l'érythropoïèse inefficace. Le mutant μ GATA-1 non clivable par la caspase-3 restaure nettement le défaut de maturation, mais pas l'apoptose.

L'implication d'Hsp70 dans la thalassémie n'avait jamais été démontrée à ce jour, excepté dans une étude descriptive de protéomique qui s'est intéressée aux protéines liées anormalement aux membranes de globules rouges de HbE/β-

thalassémie, dans laquelle ressortent les deux chaperonnes Hsp70 et AHSP. (Bhattacharya, Proteomics Clin. Appl. 2010)

Au vu de ces résultats, plusieurs questions restent cependant en suspens :

 Hsp70 intéragit-elle seulement avec l'apo α-globine ou également avec l'haloα-globine (dans sa forme héminique réduite, ou oxydée), comme le fait la seule chaperonne connue, spécifique des chaînes d'α-globine, AHSP ? Quelle est la constante d'association/dissociation de cette protéine et quelle est la différence d'affinité par rapport à AHSP ?

Pour répondre à cette question, nous allons réaliser des études d'intéraction protéique par Résonnance Plasmonique de Surface (SPR, Biacore[®]) entre Hsp70 et les différentes sous-unités d' α -globine, et entre AHSP et ces mêmes sous-unités.

 Comment expliquer la différence concernant l'apoptose entre, d'une part, les mutants Hsp70-WT et Hsp70-S400A (qui diminuent l'apoptose) et d'autre part µGATA-1 (qui ne modifie pas l'apoptose) alors que les 3 mutants ont la même action positive sur la maturation érythroïde β-thalassémique ?

Ces résultats suggèrent que GATA-1 aurait un rôle central dans la maturation mais pas dans l'apoptose. Comme nous l'avons vu dans l'introduction de cette thèse, même s'il est attribué à GATA-1 un rôle anti-apoptotique, celui-ci n'est pas du tout prouvé. De plus, dans un modèle pathologique, la myélodysplasie de bas grade, où il existe un défaut de localisation nucléaire d'Hsp70, la restauration de GATA-1 par le mutant μ GATA aboutissait aux mêmes résultats, à savoir l'amélioration de la maturation cellulaire mais pas de modification de l'apoptose. (Frisan, Blood 2012) Il n'y avait d'ailleurs pas dans les cellules myélodysplasiques de modification d'expression de la protéine Bcl-_{XL} alors que le rôle anti-apoptotique. Il serait donc intéressant d'étudier l'expression de Bcl-_{XL} dans les érythroblastes matures de β -thalassémies majeures et dans les cellules transduites par les différents mutants.

On peut considérer que l'arrêt de maturation érythroïde des β-thalassémies majeures passe par le clivage de GATA-1 consécutivement à l'absence de concentration nucléaire d'Hsp70, séquestrée dans le cytoplasme par les chaînes d'α-globine en

excès. Par contre l'apoptose semble passer par un autre mécanisme directement lié à Hsp70.

Nous suspectons qu'il existe, à l'intérieur du compartiment cytoplasmique, un autre effet délétère de la séquestration d'Hsp70 par les chaînes d'α-globine. En effet, Hsp70 est bien identifiée dans la littérature comme une protéine anti-apoptotique. Elle pourrait être détournée, à l'intérieur même du cytoplasme, d'un rôle protecteur de protéines impliquées dans l'apoptose. Son association à AIF (Apoptosis Inducing Factor) retient particulièrement notre attention. AIF est une protéine cytoplasmique qui, lorsqu'elle est transportée dans les noyaux va fragmenter l'ADN et contribuer à induire l'apoptose. Hsp70 retient AIF dans le cytoplasme cellulaire et inhibe sa translocation nucléaire. (Mjahed, Exp. Cell. Research 2012) Comme nous l'avons écrit en introduction, une seule étude montre qu'Hsp70 séquestre AIF dans le cytoplasme d'une lignée érythroïde humaine TF-1 et permet ainsi d'éviter la fragmentation d'ADN. (Lui, FEBS Lett. 2007) Hristoskova et col. ont aussi montré qu'AIF était exprimé dans le cytoplasme d'érythroblastes humains tout comme d'autres protéines impliquées dans l'apoptose et qui sont aussi des partenaires d'Hsp70 : Apaf-1 et le cytochrome c. (Hristoskova, Exp. Cell. Research 2007) Cependant, un lien entre ces protéines pro-apoptotiques et leur éventuel contrôle par Hsp70 n'a jamais été étudié dans des érythroblastes humains.

L'absence de séquestration cytoplasmique d'AIF par HSP70 dans des cellules bien hémoglobinisées du fait d'une utilisation d'Hsp70 dans un autre compartiment cytoplasmique serait une hypothèse séduisante pour expliquer l'apoptose. Nous pourrions étudier assez facilement par microscopie confocale et/ou Western Blot les localisations cyto/nucléaires d'AIF dans les érythroblastes des β-thalassémies et sa modification par les différents mutants d'Hsp70. Plus généralement, l'association d'Hsp70 à des protéines cytoplasmiques et/ou nucléaires ayant un rôle dans l'apoptose (« immobilisation » de protéines impliquées dans l'apoptose ou protection de molécules anti-apoptotiques comme Bcl-XL), pourrait être une nouvelle perspective de travail dans l'érythropoïèse physiologique.

Cette action anti-apoptotique propre d'Hsp70 éclaire également les perspectives thérapeutiques de notre travail qui doivent être doubles :

- diminuer l'intéraction avec les chaînes d'α-globine
- augmenter l'expression d'Hsp70 dans ces cellules

- Pour la première proposition, nous souhaitons réaliser un criblage de petites molécules « *in silico* » grâce à la modélisation 3D informatique. Nous pourrions ensuite tester ces molécules dans notre modèle de culture d'érythroblastes β -thalassémiques et observer l'effet sur la maturation, prolifération et apoptose. Nous devons pour cela approfondir l'étude des domaines d'intéraction entre Hsp70 et α -globine.

- Pour la deuxième assertion, les inhibiteurs des HDAC (histones déacétylases) et parmi eux l'acide valproïque (Dépakine®) pourraient être utilisés dans notre modèle de culture car ils augmentent l'expression protéique d'Hsp70 dans de nombreux modèles de cellules neuronales. (Marinova, J. Neurochem. 2009 ; Rao, Adv. Cancer Res. 2012) L'acide valproïque semble aussi induire la production d'hémoglobine fœtale dans des érythroblastes humains β-thalassémiques en milieu liquide sans qu'en soit précisé le mécanisme. (Marianna, Haemotologica 2001) Nous faisons l'hypothèse que cette augmentation d'HbF pourrait passer par une induction d'Hsp70 par l'acide valproïque permettant une meilleure disponibilité nucléaire, une protection de GATA-1 et une augmentation d'expression d'HbF. Nous avons réalisé deux expériences qui vont dans ce sens montrant une augmentation de la quantité d'Hsp70 cytoplasmique (intensité triple en microscopie confocale), un ralentissement de la différenciation, mais malheureusement pas d'effet sur la localisation nucléaire d'HSP70 et la protection de GATA-1 nucléaire. Ces expériences méritent d'être renouvelées et approfondies (gamme-dose d'acide valproïque, combinaison avec des molécules pouvant dissocier le complexe Hsp70/ α -globine etc...).

3. Quel est le mécanisme d'augmentation de l'hémoglobine F dans les cellules transduites par les mutants d'Hsp70 ou avec le µGATA-1 ?

La mise en évidence d'une augmentation de l'HbF (pourcentage de cellules F, mais aussi de la fluorescence moyenne dans ces cellules, c'est-à-dire de la concentration globale en hémoglobine F par cellule) par cytométrie de flux dans les érythroblastes transduits avec ces mutants a été une belle surprise. En effet, la perspective thérapeutique de nos travaux aurait été limitée si le pool de « bons réticulocytes » (cellules F) dans les β -thalassémies majeures n'était pas augmenté après le rétablissement de l'expression de GATA-1 dans les érythroblastes matures. En effet, des globules rouges avec des chaînes d' α -globine en grande quantité ne sont pas fonctionnels. Nous devons confirmer ce résultat important par une autre technique de dosage par HPLC (qui sera cependant moins précise dans notre système car donnera une image globale de synthèse des chaînes γ mais pas l'information sur le pool de cellules F, réellement efficaces en périphérie). Il conviendrait aussi de tester cette différenciation avec des concentrations plus faibles de SCF dans nos cultures car comme nous l'avons vu, cette cytokine induit in vitro l'HbF (voir introduction), ce qui peut expliquer les concentrations déjà importantes d'HbF dans nos cultures tant thalassémiques que de sujets sains. (Gabbianelli, Blood 2007) Cependant, ce biais est plutôt conservateur car la différence entre pourcentages de cellules F devrait être plus grande entre érythroblastes β-thalassémiques transduits par le mutant d'intérêt si les cellules contrôles transduites par le vecteur vide expriment moins d'HbF. L'autre critique que l'on pourrait faire est que l'HbF serait un marqueur de différenciation/maturation érythroïde. Or, ce ne semble pas être le cas car le pourcentage de cellules F semble décroître avec la différenciation in vitro (Friedman, J. Clin. Invest. 1985), ce que nous avons d'ailleurs observé dans nos cultures d'érythroblastes normaux et pathologiques.

Nous avons considéré que cette augmentation de production d'HbF passait par l'expression du facteur de transcription GATA-1, restauré par les transductions virales. GATA-1 semble jouer un rôle fondamental dans le « switch » des chaînes de globine même si son rôle spécifique dans l'expression des chaînes γ reste encore à bien préciser dans la littérature (voir chapitre 2.4.4.2.). Un rôle de cette protection de GATA-1 sur l'expression de BLC11A, inhibiteur principal des chaînes γ (Sankaran, Science 2008, Nature 2009), serait également intéressant à étudier dans ces expériences des transductions.

2. Hypothèses pour de nouvelles recherches découlant de ce travail de thèse

2.1. Hsp70 joue-t-elle un rôle physiologique dans l'assemblage de l'hémoglobine ?

C'est une question importante car les érythroblastes sont des cellules très particulières chez l'homme puisque Hsp70 y est physiologiquement exprimée à forte concentration dès le stade proérythroblaste, c'est-à-dire avant la production des chaînes de globine. L'érythropoïèse est donc une exception car, comme nous l'avons écrit dans l'introduction, cette chaperonne est habituellement inductible et non présente à l'état basal dans les cellules humaines non pathologiques.

Hsp70 est une protéine hautement conservée tout au long de l'évolution chez différentes espèces, de même que la structure tertiaire des chaînes de globines qui remonte à une même protéine ancestrale datant de plus de 600 millions d'années (alors même que les analogies des structures primaires entre chaînes de globine sont faibles entre espèces différentes). Cela nous permet de soulever l'hypothèse qu'Hsp70 aurait pu être sélectionnée dans l'évolution pour chaperonner les chaînes de globine ; ce qui expliquerait son expression constitutive dans les érythroblastes humains et ceux de nombreux mammifères et autres espèces (xenope, poulet...). Les expériences de modélisation informatique en 3D montrant qu'Hsp70 forme une cavité par ses 3 domaines où se fixe parfaitement l'α-globine et nos expériences de double hybride qui montrent que les chaînes de β -globine intéragissent aussi avec Hsp70 sont guelques arguments en faveur de ce rôle « évolutif ». Il faut ici rappeler que c'est actuellement l'AHSP qui est considérée comme la protéine chaperonne impliquée dans la synthèse de l'hémoglobine. Pourtant, cela n'a absolument pas été prouvé *in vitro* dans des modèles de culture érythroblastique mais seulement par des expériences d'intéraction protéique calorimétrique entre l'AHSP et l'a-globine. Cette hypothèse est basée sur des expériences biochimiques montrant le déplacement de cette intéraction par l'ajout de chaînes de β -globine dont l'affinité pour les chaînes α est plus grande (Gell, J. Biol. Chem. 2002) et par des expériences in vivo chez la souris qui sont, comme on l'a vu dans le chapitre 3.3.6., discutables. En effet, les souris invalidées pour l'AHSP (AHSP^{-/-}) ne présentent qu'une anémie modérée dont une partie importante est liée à de l'hémolyse périphérique, même s'il semble exister

des signes (modérés) d'érythropoïèse inefficace. L'autre élément sur leguel s'est basée cette hypothèse est la liaison non seulement avec l'holo-hémoglobine mais aussi avec les chaînes d'a-globine libres laissant penser qu'AHSP pourrait être impliquée dès la sortie des chaînes d' α -globine du ribosome. Comme nous l'avons souligné dans l'introduction de cette thèse, l'expression protéigue de l'AHSP au cours de la différenciation érythroblastique a été bizarrement très peu étudiée probablement car elle semble excessivement faible. Nous n'avons pas pu mettre en évidence l'AHSP par Western Blot à différents temps de nos cultures cellulaires érythroïdes effectuées à partir de cellules CD34⁺ circulantes de sujets sains. Il semblerait, dans les β-thalassémies majeures, que son expression n'apparaisse qu'en fin de différenciation dans notre système de culture (J7, J8 des cultures après tri CD36⁺) (résultats préliminaires en cours de vérification). Cela rend incertain un rôle déterminant de l'AHSP dans la synthèse de l'hémoglobine car cette protéine devrait être exprimée dès le stade basophile, au début de la production des chaînes de globine (J4-J5 dans notre système de culture). Cela pose donc la question du rôle physiologique d'Hsp70 dans cette synthèse d'hémoglobine. Des expériences d'inhibition d'Hsp70 par SiRNA pourraient être envisagées sur des érythroblastes normaux de sujets adultes exprimant le mutant µGATA-1 (pour s'affranchir de l'effet délétère de l'absence d'Hsp70 sur la protection de GATA-1 et donc sur la maturation et l'expression des chaînes de globine) en étudiant la formation d'hémoglobine dans ces érythroblastes (formation d'hémichromes, induction de ROS...). Ce sont cependant des expériences difficiles à réaliser car les érythroblastes transfectés par GATA-1 sont fragiles. L'étude sur un modèle de souris invalidée totalement ou partiellement pour Hsp70 pourrait aussi être très intéressante.

Ce rôle physiologique d'Hsp70 pourrait aussi être étudié dans les β -thalassémies mineures. En effet, chez ces patients porteurs du trait β -thalassémique, la quantité de chaînes β est parfois diminuée jusqu'à 50%, ce qui signifie donc que la moitié des chaînes α -libres sont en excès dans les cellules. (Khandros, Hematol. Oncol. Clin. N. Am. 2010) Cela n'entraîne pourtant ni anémie, ni dysérythropoïèse. Nous pouvons suspecter, dans ce modèle, qu'Hsp70 arrive à contrôler l'excès de chaînes d' α -globine libres (fonction positive) sans être totalement séquestrée dans un compartiment cytoplasmique, ce qui lui permet de jouer son rôle protecteur de GATA-1 et d'éventuelles autres protéines cellulaires. Cette hypothèse est difficile à

vérifier car il est plus difficile d'obtenir des moelles osseuses de ces patients et que nous ne sommes pas sûrs qu'ils aient beaucoup de cellules CD34⁺ circulantes, comme chez les patients β -thalassémiques majeurs, pour faire de la culture *in vitro* à partir du sang périphérique. Cependant, cela est réalisable sur du sang périphérique de sujets sains, mais il faut alors des quantités plus importantes de sang. Cette hypothèse est cependant intéressante à vérifier de même que la concentration d'Hsp70 dans les cellules qui devrait être augmentée pour compenser l'excès de chaînes α .

Si Hsp70 était importante pour l'assemblage des chaînes de globine, son expression devrait augmenter au cours de la différenciation érythroïde et suivre la concentration des chaînes de globine. C'est effectivement ce qui est observé dans la différenciation érythroblastique physiologique. (Ribeil, Nature 2007) Le mécanisme de cette induction d'Hsp70 au cours de l'érythropoïèse physiologique n'a pas été encore étudié. Nous pouvons soulever ici deux hypothèses non exclusives passant par des stress physiques secondaires à la production des chaînes de globine:

- l'induction d'Hsp70 pourrait passer par le changement de pH cellulaire qui se modifie brutalement sous l'effet de l'acquisition de chaînes de globine et de perte d'ARNm acide. La modification de pH est un facteur d'induction d'Hsp70. (Garrido, Cell Cycle 2006; Mjahed, Exp. Cell Res. 2012; Ellis, Biochem. Soc. Symp. 1989)
- l'induction d'Hsp70 pourrait aussi passer par la production de ROS lorsque débute la synthèse des chaînes de globine, car les chaînes de globine en s'oxydant sont des productrices de ROS. Les ROS à faible concentration ne sont pas toxiques pour les cellules et peuvent même servir positivement dans le métabolisme cellulaire, notamment pour la différenciation. Les ROS sont connus pour induire Hsp70. (Garrido, Cell Cycle 2006 ; Mjahed, Exp. Cell Res. 2012 ; Ellis, Biochem. Soc. Symp. 1989)

L'étude des Heat Shock Factor HSF-1 et -2, facteurs de transcription d'Hsp70 en réponse à ces stimulus, pourrait être aussi envisagée.

Enfin, la formation ou non d'un complexe entre Hsp70 et les chaînes γ de globine serait très intéressante à étudier (et si complexe il y a, comparer les constantes

d'affinité avec les autres chaînes). Nous n'avons pas dans ce travail réalisé d'expériences de double hybride avec cette chaîne γ car nous n'avions pas facilement à disposition le vecteur d'expression et que ce n'était pas le sujet central de notre thèse. Cette étude pourrait apporter peut être un éclairage sur la variation physiologique de la concentration en hémoglobine entre le nouveau né et un jeune bébé. En effet, la concentration en hémoglobine d'un nouveaux-né est d'environ 15-17 g/dL en moyenne. Elle va diminuer en quelques mois à 11-13 g/dL, corrélée à la baisse du nombre de globules rouges. Le mécanisme de cette baisse physiologique des globules rouges dans les six premiers mois de vie n'est pas connu bien que régulièrement observé par les pédiatres. Elle semble suivre le « switch » de l'hémoglobine, c'est-à-dire la perte des chaînes γ remplacées par les chaînes de β globine. Or, nous avons observé que le rapport nucléo-cytoplasmique d'Hsp70 était plus élevé dans des érythroblastes en culture issus de cellules souches provenant de sang de cordon par rapport à des cellules souches provenant de moelles adultes. On pourrait donc poser comme hypothèse que l'hémoglobine fœtale ait moins d'affinité pour Hsp70 ce qui permettrait une plus grande disponibilité d'Hsp70 pour la protection nucléaire de GATA-1 au cours de la vie fœtale. Cela expliquerait la production plus importante de réticulocytes et donc de globules rouges dans la vie fœtale qui diminuerait au changement de chaînes, si l'on considère qu'Hsp70 ait alors une plus grande affinité cytoplasmique pour l'hémoglobine adulte et, en conséquence, une disponibilité nucléaire plus faible pour GATA-1 dans les érythroblastes «adultes ».

2.2. La séquestration cytoplasmique d'Hsp70 avec comme conséquence l'absence de localisation nucléaire : un modèle dans les maladies neurodégénératives ?

Cet exemple pathologique de la β -thalassémie majeure montre, tout comme ce qui avait été mis en évidence en physiologie par JA Ribeil (Ribeil, Nature 2007) et en pathologie sur les myélodysplasies (Frisan, Blood 2012), que c'est avant tout la localisation cyto/nucléaire plus que le contenu cellulaire global d'Hsp70 qui est important au cours de l'érythropoïèse. Ce rôle pathologique d'Hsp70 en fonction de sa « compartimentalisation » subcellulaire est une voie de recherche assez peu étudiée. En effet, Hsp70 n'est le plus souvent perçue que comme un agent globalement cytoprotecteur car son hyperexpression améliore la survie cellulaire ; un rôle toxique n'est envisagé que si son expression est diminuée. Nous pensons que cette « compartimentalisation » subcellulaire d'Hsp70 pourrait être un mécanisme plus ubiquitaire, impliqué dans d'autres pathologies où Hsp70 est fortement exprimée et où des protéines cytoplasmiques malformées existent. C'est le cas des maladies neurologiques dégénératives (maladie de Parkinson, d'Alzheimer, d'Huntington, sclérose latérale amyotrophique -SLA-, maladies à prions) regroupées aussi sous le nom de « maladies des protéines mal-repliées » ou « protein misfolding diseases or disorders ». (Broadley, FEBS Lett. 2009; Muchowski, Nat. Rev. Neurosci. 2005) Au cours de ces maladies, Hsp70 joue un rôle cytoprotecteur en tentant de contrôler la toxicité des protéines malformées (protéine amyloïde Tau pour l'Alzheimer, α synucléine pour la maladie de Parkinson, la superoxyde dismutase 1 pour la SLA...) en se liant à elles (voir tableau 2 pour d'autre maladies).

Table 2 Examples of protein aggregation diseases						
Disease	Abnormal Protein	Cell Type	Intracellular Inclusion			
Alzheimer Disease	Tau	Neurons	Neurofibrillar tangles			
Amyotrophic Lateral Sclerosis (Familial)	Superoxide dismutase 1	Neurons	Bunina bodies			
Parkinson's Disease	α-Synuclein	Neurons	Lewy bodies			
Huntington's Disease	Huntingtin (polyglutamine expansion)	Neurons	_			
X-Linked Spinobulbar Muscular Atrophy (Kennedy Disease)	Androgen receptor (polyglutamine expansion)	Neurons	_			
Prion Disease	Prion protein	Neurons	_			
α ₁ -Antitrypsin Deficiency	α ₁ -Antitrypsin	Hepatocytes	_			
Alcoholic Liver Disease	Intermediate filaments	Hepatocytes	Mallory bodies			
Wilson Disease	ATP7B	Hepatocytes	_			
β-Thalassemia	α Globin	Erythrocytes	_			

<u>Tableau 2</u> : Exemples de maladies liées à des agrégats de protéines anormales (*Khandros, Hematol. Clin. N. Am. 2010*)

L'hyperexpression d'Hsp70 dans ces divers modèles cellulaires de maladies neurodégénératives, inhibe les oligomères de protéines toxiques ce qui permet de protéger la cellule neuronale contre l'apoptose. (Broadley, FEBS Lett. 2009 ; Muchowski, Nat. Rev. Neurosci. 2005) L'hyperexpression d'Hsp70 est de ce fait un axe important de nouvelles stratégies thérapeutiques de ces maladies. (Broadley, FEBS Lett. 2009 ; Hartl, Nature 2011 ; Morimoto, Genes Dev. 2008) Inversement, l'hypoexpression d'Hsp70 induit une cytotoxicité dans ces cellules. Les cellules neuronales les plus touchées par les dépôts de protéines malrepliées, dans les coupes histologiques humaines de ces maladies neuro-dégénératives, expriment d'ailleurs un niveau nettement plus faible d'Hsp70. (Broadley, FEBS Lett. 2009) Enfin, dans certains modèles cellulaires de ces maladies, il existe une hypoexpression d'Hsp70 qui serait due à la séquestration par les protéines malformées des facteurs de transcription d'Hsp70. (Broadley, FEBS Lett. 2009)

Il a été cependant envisagé, dans ces maladies neurologiques, que la séquestration d'Hsp70 par les protéines neuronales toxiques, tout en tentant de détoxifier ces protéines anormales, détourne Hsp70 de son rôle protecteur d'autres protéines cytoplasmiques. (Broadley, FEBS Lett. 2009) Il a été envisagé très récemment, dans

un modèle cellulaire humain de SLA, qu'Hsp70 pouvait être séquestrée par les agrégats de superoxyde dismutase 1 (protéine anormale dans cette maladie) dans les JUNQ (juxtanuclear quality control compartments) ou les IPOD (insoluble protein deposits), en position juxtanucléaire. Cela rendrait Hsp70 peu disponible pour ses fonctions d'élimination des protéines cellulaires anormales (éventuellement d'autres protéines que l'enzyme anormale) par le protéasome situé dans le même compartiment sub-cellulaire ce qui aggraverait la cytotoxicité. (Weisberg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012)

Le déséquilibre cyto-nucléaire qui pourrait découler de cette séquestration cytoplasmique et le lien avec l'apoptose de cellules neuronales n'a toutefois, à notre connaissance, pas été spécifiquement étudié dans ces maladies neurodégénératives alors qu'il est probable d'Hsp70 joue aussi un rôle protecteur de protéines nucléaires indispensables au bon fonctionnement de ces cellules. Seule une étude de l'équipe de Jeanne Amiel à l'hôpital Necker a montré dans la maladie d'Ondine (pathologie neuro-dégénérative avec dysautonomie entraînant des troubles de ventilation pulmonaire), liée à la présence d'une protéine anormale, Phox2B, dans les neurones du tronc cérébral, que cette protéine co-localisait, en microspopie confocale, avec Hsp70 dans le cytoplasme (cf figure issue de l'article par Trochet et al.). (Trochet, Hum. Mol. Genet. 2005) Cela semble entraîner un déficit d'expression nucléaire d'Hsp70, comparé aux cellules contrôles si on s'en réfère à la figure de cette publication reproduite ici. Ce travail n'étant pas centré sur Hsp70, les auteurs n'ont pas précisément étudié l'anomalie de répartition cyto/nucléaire et ne l'ont donc pas précisément quantifiée dans l'article.



Figure 14 : Séquestration d'Hsp70 dans le cytoplasme par des protéines anormales avec absence d'expression nucléaire, un modèle plus général de cytotoxicité ? Exemple de la maladie génétique neuro-dégénérative d'Ondine où la protéine anormale Phox-2B co-localise (2 lignes supérieures) avec Hsp70 dans le cytoplasme de neurones ce qui semble entraîner un défaut de localisation nucléaire d'Hsp70 (noyau marqué en bleu par le DAPI, Hsp70 en vert). D'après Trochet, Hum. Mol. Genet. 2005

Par un mécanisme a priori différent, Hsp70 semble impliquée dans une autre maladie musculaire dégénérative : la dystrophie musculaire de Duchenne caractérisée par une destruction musculaire par apoptose. Cette maladie génétique est due à l'absence d'une protéine, la dystrophine, qui est fondamentale pour stabiliser la membrane des cellules musculaires. De plus, l'hyperexpression d'Hsp70 dans les cellules réduit, dans des modèles de souris, la dégénérescence musculaire, a priori, en **stabilisant** une enzyme cytoplasmique (SERCA) importante pour le contrôle du flux cellulaire de calcium, très altérée dans cette maladie. (Gehrig, Nature 2012)

Enfin, n'oublions pas que dans les systèmes nerveux et musculaire existent des protéines faisant partie de la famille des globines avec des homologies de structures avec les chaînes de globines notamment myoglobine pour le muscle mais aussi, plus récemment décrites, neuroglobine (NGB) et cytoglobine (CYGB) pour les cellules neuronales (Figure 6, rappelée ici).



La neuroglobine découverte en 2000 est un monomère qui lie l'oxygène avec beaucoup plus d'affinité que l'hémoglobine ce qui amène aux cellules neuronales une protection en cas d'hypoxie et d'oxydation cellulaire (détoxifie les ROS) pour limiter les dommages cellulaires cérébraux et éviter l'apoptose. (Burmester, J. Exp. Biol. 2009) La neuroglobine est exprimée dans pratiquement toutes les cellules du système nerveux central (qui l'expriment cependant à des concentrations différentes), mais aussi du système nerveux périphérique et dans les cellules de la rétine.

La cytoglobine fait aussi partie de la grande famille des globines mais semble limitée à un sous-groupe de neurones et a un rôle de protection neuronale de l'oxydation cellulaire induite par les ROS. (Burmester, J. Exp. Biol. 2009)

On pourrait envisager comme pour les chaînes α et β de globine qu'Hsp70 puisse former avec la neuroglobine et la cytoglobine un complexe pour les protéger et les stabiliser, ce qui augmenterait leur rôle protecteur dans les cellules neuronales d'autant plus que ces deux neuroprotéines ne peuvent être induites directement par un stress cellulaire, contrairement à Hsp70. (Burmester, J. Exp. Biol. 2009) On pourrait, à l'inverse, imaginer qu'une altération de liaison avec Hsp70 ou qu'une séquestration d'Hsp70 dans d'autres compartiments subcellulaires, (par des protéines mal formées à détoxifier par exemple) puissent être, en cascade, nocives pour des cellules en situation de stress ne disposant plus assez de neuroglobine et cytoglobine fonctionnelles, protégées par Hsp70. Cette intéraction n'a cependant pas été encore étudiée à ce jour. Cette hypothèse pourrait être testée grâce à une étude de l'intéraction entre Hsp70 et ces protéines par Résonnance Plasmonique de Surface (SPR, Biacore[®]) lorsque nous aurons mis au point ce système pour l'intéraction entre Hsp70 et l'α-globine, car cela pourrait avoir des retombées thérapeutiques potentiellement importantes dans le système nerveux. Il faut rappeler ici que, même si ces différents types de globine ont une structure primaire différente, elles ont une structure tertiaire très proche, ce qui pousse à étudier leur intéraction avec Hsp70 au vu des résultats de cette thèse.

Dans le système nerveux tout comme dans l'érythropoïèse, Hsp70 pourrait aussi agir indirectement sur la synthèse d'hème car Hsp70 semble agir étroitement avec l'hème oxygénase (HO-1) (aussi appelée Hsp32 car c'est aussi une chaperonne inductible par le stress), qui dégrade l'hème. HO-1 est très impliquée dans les maladies neurodégénératives car cette enzyme a une action anti-oxydante protectrice des cellules neuronales « surchargées » par des molécules malformées, avec une très dense publication sur ce sujet (particulièrement dans la maladie d'Alzheimer).

Enfin, dans la maladie d'Alzheimer, il a été montré que l'hémoglobine mais aussi les chaînes α et γ de globine se liaient aux protéines β -amyloïdes toxiques dans les neurones ce qui participerait à la toxicité des protéines β -amyloïdes du fait d'une oxydation des chaînes de globine. (Oyama, Biochim. Biophys. Acta. 2000 ; Chuang, PloS One 2012 ; Perry, Neurobiol. Aging 2008) Une intéraction directe entre la neuroglobine et des agrégats des protéines de prion a également été rapportée. (Lechauve, J. Mol. Biol. 2009) On peut donc imaginer, dans ces maladies neurodégénératives, un ménage à trois entre des protéines mal formées, des chaînes de globine (α , γ mais aussi pourquoi pas la neuroglobine) et Hsp70. Il n'a, à notre connaissance, pas été envisagé que la séquestration d'Hsp70 dans ces agrégats puisse être le fait d'un troisième acteur comme les chaînes de globine dans leurs grandes diversités.

2.3. Rôle d'autres chaperonnes, notamment Hsp90.

Hsp90 est exprimée dans le cytoplasme des érythroblastes humains mais pas dans le noyau. (Ribeil, Nature 2007) Hsp90 est essentiellement impliquée dans la dégradation des protéines par le protéasome. Or, il semble que la dégradation protéique par ce système et par l'ubiquitinilisation soit importante dans les β -thalassémies. (Khandros, Hematol. Clin. N. Am. 2010; Weiss, Blood 2009; Hartl, Nature 2011) Plusieurs études ont montré que les chaînes α , β et γ de globine étaient ubiquitinilées. (Khandros, Hematol. Clin. N. Am. 2010) De plus, les chaperonnes Hsc70 et Hsp90 augmentent l'expression de HRI (Heme regulated inhibitor of translation) (Uma, J. Biol. Chem 1997) dont un des rôles est d'inhiber la production des chaînes de globine libres, ce qui peut donc améliorer le phénotype cellulaire dans les β -thalassémies. (Weiss, Blood 2009; Chen, Blood 2007) L'étude de l'expression d'Hsp90 et de sa modulation dans la β -thalassémie, son rôle dans la dégradation des chaînes de globine par le protéasome, pourraient donc être un axe d'étude original.

2.4. Accélération de la différenciation érythroïde des β -thalassémies: une caractéristique non expliquée par Hsp70

Comme nous l'avons vu, la séquestration cytoplasmique d'Hsp70 par les chaînes d' α -globine permet d'expliquer l'arrêt de maturation et l'apoptose augmentée des érythroblastes polychromatophiles, mais n'explique pas l'accélération de maturation jusqu'au stade polychromatophile, troisième caractéristique de l'érythropoïèse inefficace des β -thalassémies. En effet, dans notre travail, ni les mutants surexprimant Hsp70, ni µGATA-1 ne modifient la différenciation jusqu'au stade polychromatophile.

Nous avançons comme hypothèse que le TGF-β1 ou un membre de la famille des TGF-β pourraient être impliqués dans cette différenciation.

Cette hypothèse est envisagée sur la base des éléments suivants:

- Il a déjà été démontré dans notre laboratoire et par d'autres équipes que le TGF-β1 accélérait la différenciation érythroïde d'érythroblastes normaux (Zermati, Exp. Hematol. 2000) ce qui place cette cytokine comme une cible potentielle.
- Le TGF-β1 semble augmenté dans le sérum de patients β-thalassémiques splénectomisés, même si les études, comme nous l'avons vu dans le chapitre 3.3.8., sont peu nombreuses et controversées. (Moshtaghi-Kashanian, Cytokine 2006)
- Nous avons réalisé des expériences préliminaires (n=3) en rajoutant un anticorps bloquant le TGF- β 1 à la dose de 10 µg/mL (*R et D system*) ou son isotype contrôle dans nos cultures cellulaires de patients β -thalassémiques majeurs dès le tri-CD36⁺ (deuxième phase de nos cultures, reproduisant la différenciation érythroïde terminale). Nous avons observé que l'anticorps bloquant induisait une augmentation franche de la prolifération cellulaire associée à un ralentissement de la différenciation et une baisse de l'apoptose sans modifier l'indice de maturation terminale. Cela soulève deux points : (1) le TGF-β1 participerait à l'accélération de la différenciation érythroïde βthalassémique et (2) la synthèse du TGF-β1 serait autocrine par les cellules érythroïdes elles-mêmes, puisque notre système de culture en deux temps se fait sans contamination par d'autres cellules hématopoïètiques. Nous n'avons cependant pas encore réalisé les dosages appropriés dans les surnageants des érythroblastes β -thalassémiques en culture. Une sécrétion autocrine du TGF-β par des précurseurs érythroïdes a déjà été mise en évidence, mais celle-ci semblait limitée, chez l'homme sain à des précurseurs plus immatures (BFU-E ou stades précédents). (Akel, Stem Cells 2003 ; Böhmer, Stem Cells 2004)
- La finalité d'une sécrétion du TGF-β par les érythroblastes β-thalassémiques n'est pas évidente, à première vue, car le TGF-β ralentit la prolifération en diminuant le nombre de mitoses. Cependant, le TGF-β pourrait compenser ce rôle néfaste en induisant la production de chaînes γ de globine et donc augmenter le nombre de cellules F aux dépens de la production cellulaire (qui de toute façon va être arrêtée après le stade polychromatophile dans des

cellules contenant une concentration trop importante d' α -globine libre). Cette action sur l'HbF a été démontrée dans des cultures *in vitro*. (cf chapitre 2.4.4.3. de l'introduction et Peschle, Blood 1993; Whojda, Blood 2003; Bhanu, Blood 2005; revue dans Gabbianelli, 2009)

 Le rôle physiopathologique de cytokines de la famille du TGF-β a été étudié avec plus de détail dans un modèle de souris β-thalassémiques intermédiaires (travail de thèse de Michaël Dussiot dans notre laboratoire, article en révision). Chez ces souris, le blocage du GDF11 (growth differentiation factor 11), un membre de la famille du TGF-β améliore l'érythropoïèse inefficace, l'anémie et les marqueurs d'hémolyse des souris. Le GDF11 semble également augmenté dans le sérum de patients βthalassémiques majeurs.

Rôle des ROS dans l'érythropoïèse inefficace des β-thalassémies

De nombreux auteurs suspectent que l'induction des ROS par les chaînes d' α globine en excès ait un rôle dans la dysérythropoïèse des patients β -thalassémiques (cf chapitre 3.3.4 de l'introduction).

En effet, les ROS sont augmentés dans les érythroblastes β-thalassémiques par rapport à des érythroblastes contrôles mais leur concentration ne semble pas augmenter pendant l'érythropoïèse ; ce qui en fait comme nous l'avons vu en introduction un « mauvais client » pour expliquer les anomalies observées au stade mature de l'érythroblaste polychromatophile. (De Franceschi, Haematologica 2011 ; Leecharoenkiat, Blood, Cell Mol. Dis. 2011) Par contre, l'induction précoce des ROS au cours de la différenciation pourrait expliquer trois événements dans les érythroblastes thalassémiques :

- La production du TGF-β et donc l'accélération érythroïde (si on confirme bien que cette caractéristique passe par la production autocrine de TGF-β par les érythroblastes). Les ROS sont en effet décrits comme des activateurs de sécrétion du TGF-β.
- Une précocité d'activation de la caspase-3. Nous avons en effet mis en évidence par Western Blot (n=1) et par cytométrie de flux (n=6) que les caspases étaient activées plus précocément (J3 au lieu de J5-J6, données non rapportées ici) chez les patients β-thalassémiques majeurs. Cela est peut

être simplement le reflet de l'accélération de la différenciation érythroïde mais pourrait aussi être un effet des ROS car ils peuvent dans d'autres modèles cellulaires activer les voies extrinsèque (Fujisawa et al, 2007) mais aussi intrinsèque des caspases via l'intéraction avec des protéines de perméabilité mitochondriale. (Circu, 2010)

 L'augmentation de la concentration cellulaire d'Hsp70. En effet, les ROS peuvent induire la synthèse d'Hsp70. (Gorman, FEBS Lett. 1999) Cela permettrait de "contrecarrer" le plus longtemps possible l'effet toxique des chaînes de globine et de repousser l'effet toxique à des stades de différenciation plus tardifs.

Une étude plus précise de l'expression des ROS au cours de la différenciation érythroïde β -thalassémique que celles décrites dans la littérature, et son lien avec la sécrétion du TGF- β , la synthèse d'Hsp70 et avec l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose mérite d'être développée.

Rôle de l'hémine dans la différenciation érythroïde terminale

L'hémine est un accélérateur de la différenciation érythroïde. (Bonanou-Tzedaki, Cell Different 1981 ; Theodorakis, Mol Cell Biol. 1989 ; Bensaude, Nature 1983) La place de cet hème oxydé, augmenté dans les érythroblastes β -thalassémiques, dans l'accélération de la différenciation érythroïde des β -thalassémies n'a pas été, à notre connaissance, étudié.

2.5. Tableau récapitulatif des perspectives de travail

Axes de recherche	Technologies utilisées	Expériences à réaliser	Collaboration vs labo OH
Études de l'affinité d'Hsp70 avec les sous-types de chaînes de globine et comparaison avec AHSP	SPR, Biacore	- Étude d'affinité, constantes d'association et de dissociation	Collaboration Pasteur
Rôle propre d'Hsp70 sur l'apoptose dans l'érythropoïèse normale et pathologique	 Cultures cellulaire <i>in vitro</i> Transductions virales mutants Hsp70-WT, Hsp70-S400A, μGATA-1 WB et MC 	 modification de la protéine anti-apoptotique Bcl-XL modification de la localisation d'AIF en fonction de la « disponibilité » d'Hsp70 	Labo OH
Effet de GATA-1 sur le switch des chaînes de globine dans les β- thalassémies : augmentation des chaînes γ	 Cultures cellulaire in vitro Transductions virales : mutants Hsp70-WT, Hsp70-S400A, μGATA-1 HPLC WB et MC 	 confirmer les résultats par dosages des chaînes par HPLC tester des concentrations plus faibles de SCF en culture 	Collaboration CEA Labo OH
		- modification de BCL11A par les mutants	Labo OH
Criblages de molécules qui empêchent l'interaction α- globine/HSP70	<i>In silico</i> Double hybride en levure	Tester une banque de molécules dans notre modélisation mathématique Tester ensuite l'efficacité en double hybride	Collaborations ENS Cachan et INSERM Dijon
Tester ces nouvelles molécules <i>in vitro</i> dans les β- TM	Cultures cellulaires β-TM	Cultures avec ces molécules. Étude de la maturation, apoptose, prolifération cellulaire	Labo OH
Tester des molécules, utilisables chez l'homme, qui augmentent l'expression d'Hsp70 dans les érythroblastes	Cultures cellulaires β-TM	Tester des inhibiteurs d'HDAC notamment acide valproïque et SAHA	Labo OH
Rôle physiologique d'Hsp70			
dans la synthèse d'hémoglobine Rôle d'Hsp70 dans l'assemblage de l'hémoglobine	SiRNA Hsp70 dans des érythroblastes normaux transduits par µGATA-1 Cultures cellulaires	Étudier l'apparition d'anomalies d'assemblage de l'hémoglobine (hémichromes, ROS, benzidine)	Labo OH
Étude d'Hsp70 dans les β- thalassémies mineures	In vivo souris Hsp70 ^{-/-} MC Cultures cellulaires	Expression d'Hsp70 dans le cytoplasme. Rapport nucléo-cytoplasmique et expression de GATA-1	Labo OH

La concentration croissante	- Cultures cellulaire de	- modification d'Hsn70 ·	Labo OH
d'Hen70 au cours de	CSP et sang de cordon <i>in</i>	* en fonction du pH	Luoo on
l'émithnono"èse normale est	vituo	* on fonction do lo	
r erythropoiese normale est-	viiro	· en fonction de la	
elle liee a l'acquisition des		production des ROS	
chaînes de globine ?		(utilisation d'anti-	
		oxydants)	
		- Rôle des HSF	
Rôle physiologique d'Hsp70	Culture cellulaire de CSP	Comparer l'intensité cyto-	Labo OH
dans la baisse physiologique	et sang de cordon <i>in vitro</i>	nucléaire d'Hsp70 entre	
du nombre de globules	WB et MC	cellules issues de sang de	
rouges dans la première		cordon (HbF majoritaire)	
année de vie humaine		et de moelle de sujets	
		sains (HbA maioritaire)	
	Double hybride en	Déterminer si Hsp70	Collaborations
	culture	forme un complexe avec	Pasteur
	SPR Biacore	les chaînes y par double	et Dijon
	STR, Blueore	hybride puis confirmer	et Bijon
		nyoride puis comme	
		par interaction protecture	
		en comparant l'affinite	
		avec les autres chaines de	
		globine.	
		DAL 1	
Rôle d'Hsp90 dans	Culture cellulaire <i>in vitro</i>	Rôle dans	Labo OH
l'érythropoïèse inefficace	WB et MC	l'ubiquitinilisation ?	
des β-TM			
Rôle du TGF-β dans	Cultures cellulaires in	- Doser les surnageants de	Labo OH
l'accélération de la	vitro	culture	
différenciation érythroïde	Dosages ELISA	- Utiliser anti-TGF-β	
des β-TM	Anticorps bloquants	bloquant en culture	
•		- Étude de la signalisation	
		du TGF-β (smad) sur	
		cellules en culture	
Rôle des ROS dans	Cultures cellulaires in	- Utilisation d'anti-	Labo OH
l'érythropoïèse inefficace	vitro	oxydants	
des B-TM		- Effet des ROS sur	
F		production du TGE-B et	
		sur l'activation précoce	
		des caspases	
		F	
Rôle de la séquestration	Cultures cellulaires	Étudier le rapport cyto-	Collaborations à
cytoplasmique	neuronales	nucléaire d'Hsp70 dans	déterminer
d'Hsp70 dans l'apoptose	MC	ces maladies	
neuronale des maladies	Utilisation de mutants	Effet des mutants	
neurodégénératives avec	nucléaires d'Hsp70	d'Hsp70 sur la viabilité	
« misfolding proteins »	indefeaties a risp/o	des cellules neuronales	
Hsp70 : une chaneronne de	SPR Biacore	- Étude d'affinité	Collaboration Pasteur
la neuroglobine et		constantes d'association	et Bicêtre
cytoglobine ?		et de dissociation	
cytoground .			

 $\begin{array}{l} AHSP: \alpha\mbox{-hémoglobin stabilizating protein}; SPR: Résonnance Plasmonique de Surface; WB: Western Blot; \\ MC: microscopie confocale; \\ \beta\mbox{-}TM: \\ \beta\mbox{-}thalassémies majeures}; \\ Hb: hémoglobine; \\ HSF: Heat Shock factor; \\ Labo OH: \\ laboratoire Olivier Hermine \end{array}$

CONCLUSION

Nous avons montré dans ce travail que la protéine Hsp70 était une chaperonne des chaînes d' α -globine libres. Dans une condition pathologique comme la β -thalassémie majeure, où l'une des deux chaînes composant l'hémoglobine (la β globine) est absente, l'accumulation de chaînes α libres, très instables, séquestre Hsp70 dans le cytoplasme des érythroblastes polychromatophiles. Cela entraîne alors un déficit d'expression nucléaire d'Hsp70 qui n'est plus capable de protéger GATA-1, le facteur de transcription majeur de l'érythropoïèse. Il s'ensuit une apoptose des cellules et un arrêt de maturation à ce stade cellulaire.

Nous suspectons que l'accélération de la différenciation érythroïde jusqu'au stade polychromatophile, qui est la troisième caractéristique de l'érythropoïèse inefficace observée dans cette maladie, est due à une sécrétion autocrine d'un membre de la famille du TGF- β par les érythroblastes.

Les acteurs de la dysérythropoïèse inefficace des β -thalassémies majeures sont ainsi représentés sur le schéma ci-dessous. Ce sont potentiellement des nouvelles cibles thérapeutiques de cette maladie.



ANNEXES

ANNEXE 1 : Revue générale sur la dysérythropoïèse β-thalassémique (co-premier auteur)

ANNEXE 2 : Autres articles sur le sujet en tant que co-auteurs

ANNEXE 3 : Présentation du travail dans des congrès. Prix

ANNEXE 1 : Revue générale sur la dysérythropoïèse β -thalassémique: co-premier auteur

Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal Volume 2013, Article ID 394295, 11 pages http://dx.doi.org/10.1155/2013/394295

Review Article

Ineffective Erythropoiesis in β -Thalassemia

Jean-Antoine Ribeil,^{1,2,3,4,5} Jean-Benoit Arlet,^{1,3,4,5,6} Michael Dussiot,^{1,3,4,5,7} Ivan Cruz Moura,^{3,4,5,7} Geneviève Courtois,^{1,3,4,5} and Olivier Hermine^{1,3,4,5,8}

¹ Centre National de la Recherche Scientifique-Unité Mixte de Recherche 8147, Université Paris V, René Descartes,

Hôpital Necker, Paris, France

² Département de Biothérapie, Faculté de Médecine Paris Descartes, Sorbonne Paris-Cité et Assistance Publique—Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Paris, France

- ³ Fondation Imagine, Institut des Maladies Génétiques, Faculté de Médecine Paris Descartes,
- Sorbonne Paris-Cité et Assistance Publique—Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Paris, France

⁴ Laboratoire d'Excellence des Globules Rouges (GR-ex), Paris, France

- ⁵ Fondation Imagine, Université Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité, Paris, France
- ⁶ Service de Médecine Interne, Faculté de Médecine Paris Descartes,
- Sorbonne Paris-Cité et Assistance Publique—Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France
- ⁷ INSERM U 699, Hôpital Bichat, Université Paris Diderot, Paris, France
- ⁸ Service d'Hématologie, Faculté de Médecine Paris Descartes,

Sorbonne Paris-Cité et Assistance Publique—Hôpitaux de Paris Hôpital Necker, Paris, France

Correspondence should be addressed to Jean-Antoine Ribeil; jean-antoine.ribeil@nck.aphp.fr

Received 28 December 2012; Accepted 3 February 2013

Academic Editors: Y. Al-Tonbary, M. A. Badr, A. El-Beshlawy, and F. Tricta

Copyright © 2013 Jean-Antoine Ribeil et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

In humans, β -thalassemia dyserythropoiesis is characterized by expansion of early erythroid precursors and erythroid progenitors and then ineffective erythropoiesis. This ineffective erythropoiesis is defined as a suboptimal production of mature erythrocytes originating from a proliferating pool of immature erythroblasts. It is characterized by (1) accelerated erythroid differentiation, (2) maturation blockade at the polychromatophilic stage, and (3) death of erythroid precursors. Despite extensive knowledge of molecular defects causing β -thalassemia, less is known about the mechanisms responsible for ineffective erythropoiesis. In this paper, we will focus on the underlying mechanisms leading to premature death of thalassemic erythroid precursors in the bone marrow.

1. Introduction

Normal human adult hemoglobin (Hb) A (HbA) consists of two pairs of globin chains, $\alpha_2\beta_2$, of which synthesis is normally tightly coordinated to ensure equal production. β -thalassemia, one of the most common inherited hemoglobinopathy in the world, is due to autosomal mutations in the gene encoding β -globin which induce an absence or low-level synthesis of this protein in erythropoietic cells [1]. The consequence of these mutations is an imbalance of α/β -globin chain synthesis, mostly evident in the homozygous forms, leading to the accumulation of free α -globin chains forming highly toxic aggregates [2]. Thalassemic patients suffer from anemia resulting from shortened red blood cell (RBC) survival, by hemolysis, and erythroid precursors premature death in bone marrow (ineffective erythropoiesis).

The first description of thalassemia was reported by Dr. Thomas Cooley in 1925. There are a multiplicity of different genetic mutations in β -thalassemia that give rise to a clinically heterogeneous spectrum ranging from asymptomatic expression (thalassemia minor) and mild clinical anemia (thalassemia intermedia) to classical, fatal Cooley's anemia. The term "Cooley's anemia," now termed β^0 -thalassemia major (TM), has been used synonymously with clinically severe forms of β -thalassemia, characterized by a very high α /non- α chains ratio, severe ineffective erythropoiesis, and dependence on RBC transfusions to sustain live. Regular transfusions (average every month) expose these patients to iron overload and its live threatening systemic consequences, which require iron chelation [1].

It is well established that the α /non- α ratio correlates with the severity of disease [1, 3]. However, genotypic variability impairing globin chain synthesis at known loci is often insufficient to explain the heterogeneity in clinical phenotypes of individual patients with the same genotype, suggesting that other genetic modulations might exist [1, 4]. The molecular mechanisms underlying the heterogeneity and occasional severity of the syndrome remain obscure and are not the object of this paper.

The pathophysiology of β -thalassemia has been the subject of several extensive reviews, particularly on its molecular and genetics basis [5]. In this paper, we will focus on the mechanisms leading to end-stage maturation blockade and thalassemic erythroid precursors premature destruction in the bone marrow. Their understanding will probably be the key for developing novel therapeutic approaches improving anemia in β -thalassemia. In order to describe mechanisms underlying ineffective erythropoiesis, we will first summarize the current knowledge on normal hemoglobin synthesis and normal erythropoiesis.

2. Hemoglobin Synthesis

Two distinct globin chains α and β (each carrying an individual heme molecule) interact to form hemoglobin dimers α/β , and two dimers combine to form a hemoglobin tetramer $\alpha_2\beta_2$: the functional form of hemoglobin carrying oxygen.

Excepted the very first weeks of embryogenesis, in which zeta chains are produced, one of the globin chains is α and the second chain is called "non- α ." The main (98%) hemoglobin type in the normal human adult consists of two α and two β chains ($\alpha_2\beta_2$ HbA); the minor type (2%) consists of 2α and 2δ chains ($\alpha_2\delta_2$ HbA2). Usually, globin chains synthesis is relatively balanced, even if some studies report a slight excess of α chains as a soluble pool [3, 6, 7]. In contrast, fetal erythrocytes contain another type of hemoglobin consisting of 2α and 2γ chains ($\alpha_2\gamma_2$ HbF), which can attract more oxygen effectively from the maternal blood.

Globin chains originating from a common ancestral type display a varying degree of homology. Two clusters of globins genes are known: the first one on chromosome 16 for α -like genes (two α -globin genes, α_1 and α_2 , and two zeta genes) and the second one on chromosome 11, for β -like genes. The 5' to 3' order of β -like globin genes on chromosome 11 (ε - $^{G}\gamma$ - $^{A}\gamma$ - δ - β , two γ genes) reflects their sequential activation and silencing, during the transition from embryonic to fetal and from fetal to adult "hemoglobinopoiesis," called "hemoglobin ontogeny" or "hemoglobin chain switch."

3. Erythropoiesis

Erythropoiesis is defined as the pathway producing mature RBC from hematopoietic stem cells. This process includes

several steps restricting differentiation and proliferation of cells which undergo this erythroid program, depending on sequential and specific erythroid gene expression. Erythropoiesis is regulated by combined effects of microenvironment and growth factors that promote survival, proliferation, and/or differentiation of erythroid progenitors and nuclear factors that regulate transcription of genes involved in survival and establishment of the erythroid phenotype. RBC production is orchestrated by a complex network of transcription factors, among which GATA-1, the master gene of erythropoiesis, positively regulates specific erythroid genes such as erythropoietin receptor (EpoR), glycophorin (GpA), and globin chains. Moreover, together with the transcription factor STAT5 (activated through EpoR activation by erythropoietin (Epo)), GATA-1 induces the expression of the antiapoptotic protein Bcl-xL [8].

Committed erythroid progenitors differentiate into the first morphologically identified cell of the erythrocyte lineage: the proerythroblast. Next steps of erythroid differentiation are accompanied by temporally regulated changes in cell surface protein expression, reduction in cell size, progressive hemoglobinization, and nuclear condensation (successively called basophilic erythroblast, polychromatophilic erythroblast, and acidophilic erythroblast, the last nucleated cell of the mammalian erythrocyte lineage), which culminate in reticulocytes cells by nucleus, RNA, and mitochondria extrusion. In addition, erythroid maturation requires a transient activation of caspase-3 at the basophilic stage and translocation into the nucleus of the inducible heat shock protein 70 (Hsp70) to protect GATA-1 from caspase-3 cleavage [9, 10].

This process occurs within the erythroblastic island, in which a macrophage is surrounded by erythroblasts at all stages of maturation [11, 12]. The production of erythrocytes is the largest quantitative output of the hematopoietic system with estimated production rates of 2×10^{11} erythrocytes per day. The program of erythroid proliferation and differentiation must be positively and negatively regulated to ensure a continuous but tightly controlled production of RBC.

3.1. Positive Regulation of Erythropoiesis. Erythropoiesis is controlled by the combined effect of two major cytokines, stem cell factor (SCF) and Epo. SCF induces proliferation and survival and slows down differentiation of early erythroid progenitors and precursors towards the basophilic erythroblast stage. Epo is responsible of the finely tuned homeostatic control of erythrocyte numbers by tissue oxygenation. Interaction of Epo with the EpoR induces, through JAK2 activation, multiple signalling pathways involving PI3 kinase, Akt, and STAT5, which prevent apoptosis, supporting erythroid progenitors proliferation and allowing erythroid program to occur [13–15].

3.2. Negative Regulation of Erythropoiesis by Apoptosis. The negative regulation of erythropoiesis is mainly due to apoptosis, a fundamental cellular mechanism allowing clearance of unneeded or potentially dangerous cells. Apoptotic programs require the action of a family of cysteine-dependent and aspartate-specific proteases called caspases. Two classes of

caspases are described: initiators (caspase-8 and -9) and effectors (caspase-3 and -7) [16, 17]. Caspase-8 is activated by the death receptor pathway after cell surface receptorligand interaction [18]. In contrast, caspase-9 is activated by events causing intracellular damages and alterations in mitochondrial membrane potential (i.e., the mitochondrial pathway) [19, 20]. Activated caspase-8 and caspase-9 then activate effectors such as caspase-3 that cleaves GATA-1, Tal-1 [21, 22], and proteins involved in cytoplasm, nucleus, and DNA integrity, which allow the cell death program to occur.

3.3. Role of Cell Death Receptors and Epo. Death receptors of the TNF receptor (TNF-R) superfamilies (Fas-L, TNF- α , TRAIL) activate the extrinsic apoptotic pathway. Fas and Fas-L are expressed in cultured erythroblasts, but controversies regarding the level and differentiation stage at which they are expressed have been reported. Some studies suggest the existence of a negative regulatory feedback operating at low Epo level in a paracrine pathway. In this system, Fas-L expressing mature erythroblasts displays cytotoxicity against immature erythroblasts expressing Fas [23, 24]. Epo is able to partially protect immature erythroid cells from Fas-mediated apoptosis. Fas and Fas-L are therefore major regulators of erythropoiesis. In addition Fas/Fas-L interaction results, through caspase-8 activation, in GATA-1 cleavage which blocks erythroid differentiation and maturation [25].

The control of mature RBC production may be summarized as follow: at low doses of Epo, cells die by apoptosis; at intermediary doses, cells are arrested in their differentiation and maturation (through GATA-1 cleavage) or enter a program of apoptosis depending on the number of mature erythroblasts in the bone marrow; at high dose, erythroid progenitors and precursors pursue their maturation independently of the number of mature erythroid precursors.

3.4. Role of Caspases and Hsp70 in Differentiation and Maturation of Erythroid Cells. The terminal differentiation of erythroid cells exhibits some similarities with apoptosis, such as reduction in cell size, chromatin condensation, and degradation of nuclear components. A transient activation of caspases by the mitochondrial pathway has been shown, by our group and others, to be required for erythroid cells differentiation but to not induce neither GATA-1 cleavage nor apoptosis. We have more recently reported that Hsp70, an ubiquitous chaperone constitutively expressed during erythroid differentiation, protects GATA-1 in the nucleus from caspase-3-mediated proteolysis during caspase activation. These results strongly indicate that Hsp70 is another key erythroid antiapoptotic protein protecting GATA-1 from caspase-3-mediated cleavage and consequently allowing Bclx₁ expression [9, 10].

4. β-Thalassemia Ineffective Erythropoiesis

4.1. Evidences for an Ineffective Erythropoiesis in β -Thalassemia. Dyserythropoiesis in β -thalassemic patients was suspected for a long time since it is largely recognized that many patients with an inadequate transfusional regimen have a dramatic expansion of the hematopoietic marrow and extramedullary hematopoiesis, which can lead to extensive bone deformity and/or bone marrow mass and splenomegaly. Erythrokinetic assays, done in the 50[']s, showed that the rate of peripheral RBC destruction in β -thalassemia was insufficient to explain severe anemia [26, 27]. Then, ferrokinetic studies done in the 70[']s, studying incorporation of ⁵⁹Fe into newly formed RBC, suggested that probably 60%–80% of erythroid progenitors were arrested in proliferation and/or underwent death [28].

The bone marrow of patients suffering from β -thalassemia contains five to six times the number of erythroid precursors observed in healthy controls [29], with increased basophilic and polychromatophilic erythroblasts and decreased orthochromatic erythroblasts [29–32]. Moreover, it has been shown that β -thalassemic bone marrow erythroblasts contain electron-dense alpha-globin inclusion (aggregates) beginning at early polychromatophilic stages, which increase in size and frequency during subsequent maturation [33].

Taken together, these results resume the findings of β -thalassemia dyserythropoiesis in human: expansion of very early erythroid precursors (proerythroblasts and earlier stages) and then ineffective erythropoiesis. Ineffective erythropoiesis defines the suboptimal production of mature erythrocytes from a proliferating pool of immature erythroblasts. It is thus characterized by (1) accelerated erythroid differentiation, (2) maturation blockade at the polychromatophilic stage, and (3) death of erythroid precursors [29, 30, 32, 34, 35] (Figure 1).

Although early erythroid progenitors expansion is believed to be due to a dramatic increased in Epo level as a result of the anemic state feedback [36], other mechanisms, yet not known, might be involved. In addition, precise pathophysiological mechanisms of accelerated erythroid differentiation and maturation arrest are still unknown. However, mechanisms underlying cell death were more studied and we intend at that point to review the different players of this death "game."

4.2. Enhanced Apoptosis Is a Key Feature of Ineffective Erythropoiesis in Human β -Thalassemia. It was evidenced in the 90s that β -TM erythroid precursors, but neither lymphoid and nor mycloid precursors underwent increased apoptosis (among 3- to 4-fold increased compared to healthy controls) as detected in human and mice bone marrow by an increase in DNA laddering (a sign of enhanced nucleosomal DNA cleavage, occurring specifically during apoptosis) and then confirmed by TUNEL labelling and exposure of phosphatidyl serine assessed by Annexin V labelling by FACS analysis [29, 30, 32]. In vitro findings corroborate the reduced cell expansion in β -TM erythroid cultures and enhanced apoptosis at the polychromatophilic stage of differentiation [32].

In spite of the markedly increased rate of apoptosis of β -thalassemic erythroid precursors, BM smears of these patients do not show high increased number of dying erythroblasts. Indeed, 15% to 20% of bone marrow erythroid precursors (CD45⁻/CD71⁺) present apoptotic features in



FIGURE 1: Difference between normal and β -thalassemia ineffective erythropoiesis. Erythropoiesis is the pathway producing mature RBCs from hematopoietic stem cells, including several proliferation and differentiation steps. Erythroid differentiation is accompanied by temporally regulated changes in cell surface protein expression, reduction in cell size, progressive hemoglobinization, and nuclear condensation and extrusion. β -thalassemia dyserythropoiesis in human is characterized by expansion of very early erythroid precursors (proerythroblasts and earlier stages) and then ineffective erythropoiesis. Ineffective erythropoiesis defines the suboptimal production of mature erythrocytes from a proliferating pool of immature erythroblasts characterized by (1) accelerated erythroid differentiation, (2) maturation blockade at the polychromatophilic stage, and (3) death of erythroid precursors.

aspirates [29, 30, 32]. This paradox might be explained by increased phagocytosis of abnormal precursors erythroblasts expressing phosphatidyl serine by bone marrow macrophages whose number and activation are enhanced, respectively, by about 2-fold in TM [29, 37, 38]. As a consequence, the delivery of thalassemic RBCs to the peripheral blood in the β -TM major patients is much reduced.

4.3. Apoptotic Pathways Involved in β -Thalassemia Ineffective Erythropoiesis. Studies of apoptotic death receptor pathways have shown that Fas and FasL are coexpressed early and at all stages of terminal differentiation. Both proteins are downregulated in bone marrow or spleen in proerythroblast and basophilic cells in β -thalassemic mice compared to control mice *in vivo*. No statistically difference was found in more mature cells. This down regulation in Fas/FasL expression might be a marker of erythropoietic stress [39] and might explain at least in part erythroid expansion.

Regarding the intrinsic apoptotic pathway, it was expected that it would have been also involved because it could be induced by cellular oxidant injury. Nevertheless, the involvement of this mitochondrial pathway has not been evidenced to date in β -thalassemia [40].

4.4. Role of Oxidant Injury in β-Thalassemia Ineffective Erythropoiesis

4.4.1. Excess of Unmatched Globin Chains Generates Reactive Oxygen Species (ROS). Occurrence of increased death at the polychromatophil stage of differentiation in TM [32] coincides with the stage of intense hemoglobinization [4, 27, 41, 42].

It could partially be explained by accumulation and precipitation of the unmatched α -globin chains at this stage, forming aggregates [33]. Indeed, there is several evidence that membrane components oxidation might play an important role in β -thalassemia pathophysiology [5, 43]. Free α -globin which is highly unstable and bound to heme and iron could generate reactive oxygen species (ROS) that damage cellular proteins, lipids, and nucleic acids [44, 45]. Data describing ROS production during erythroid differentiation in thalassemia are scarce [46]. A significant increase in ROS production both in early and late erythroid precursors compared to normal erythroblasts was evidenced in β thalassemia intermedia [35] or β -thalassemia/HbE [34]. Thus it was speculated that the excess of ROS, by damaging components of RBC, might reduce lifespan of these cells and cause a premature RBC clearance by hemolysis (a passive process) [45]. However there is no robust evidence that ROS production is the direct cause of increased apoptosis in β thalassemic erythroid cell precursors [5]. The observation that there are no differences [35] or a dramatic decrease [34] in ROS levels during thalassemic erythroid differentiation pleads against a direct mechanism leading to high ROS levels and apoptosis, since significant increased apoptosis was only observed in late differentiation stage (polychromatophilic stage and after) [32]. Actually, the direct link between increase of ROS and apoptosis has never been demonstrated in normal human erythroid cells. However in other cell models, ROS activate apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) and Junkinase which can induce apoptosis (extrinsic or intrinsic
signaling pathway) [47]. ROS are also known to trigger the intrinsic apoptotic cascade via interactions with proteins of the mitochondrial permeability transition complex [48].

In conclusion, even if increased ROS levels might be an actor of erythroid cell precursors death by inducing damages of erythroid cell components, the pathophysiological relationship between apoptosis and accumulation of the unmatched α -globin chain in erythroblasts needs to be clarified. To date, no data provide clear evidences that the apoptotic mechanism involves ROS. On the other hand, the role of ROS in accelerated cell differentiation, another characteristic of ineffective erythropoiesis, is questionable [34] since antioxidants inhibit the *in vitro* erythroid progenitors differentiation from mice fetal liver [49].

4.4.2. Damaging Membrane Structures: A Cause of Ineffective Erythropoiesis? Unmatched α -globin chains and ROS production could induce alterations in membrane deformability, stability, and cellular hydration in addition to damages to cytoskeleton, explaining peripheral hemolysis [50]. Protein 4.1, a major component of the skeleton controlling its crosslinking, is partially oxidized in β -thalassemia's mature erythroblasts [51]. α -globins accumulation can occur even from the proerythroblast stage and such deposits were shown to colocalize with areas of defective assembly of the membrane skeletal proteins spectrin and protein 4.1 [31, 52]. Furthermore, very early in erythropoiesis, a defective assembly of the transmembrane band 3 protein was reported, which was not spatially related to α -globin deposits. This band 3 defect seems to disappear at the intermediate or late normoblast stage, suggesting either that the defect was temporary or that it severely affected band-3-deficient erythroid precursors which died and were removed. Furthermore, oxidant injury led to clustering of band 3, which in turn produced a neoantigen that bound IgG and complement [5, 53]. Extramembranous IgG/complement complex provided signals for macrophages to remove such affected erythroid precursors and RBC.

All these studies showed that β -thalassemic RBC membranes exhibited abnormalities in membrane skeletal proteins. Thus, it could also be postulated that the accumulation of α chains destabilizes the membrane and could participate in ineffective erythropoiesis, but it cannot be the unique explanation of the major increase of apoptosis [30, 31].

4.4.3. The α -Hb-Stabilizing Protein (AHSP) Is an Erythroid-Specific Private Chaperone Protein That Specifically Binds α -Hb. Recently, an α -hemoglobin-stabilizing protein (AHSP) was identified. This protein specifically binds to and stabilizes free α chains. AHSP is a 102 amino acid erythroid-specific protein induced by the essential erythroid transcription factor GATA-1 [54]. AHSP is abundant in late-stage erythroid precursors, in which its expression kinetics match with α globin ones [55]. Stabilization of native folded α -globin by AHSP might be particularly important when heme quantity is limited, for example, during iron deficiency. Indeed, the presence of functional iron response element (IRE) in the 3' untranslated region of human *AHSP* mRNA stabilizes this transcript in low iron conditions [56, 57].

A second AHSP function is to detoxify the excess of α globin chains. Protein interaction screening has shown that AHSP binds free α globin and α -hemoglobin (unmatched α -globin chains bound to heme) (α -Hb). Subsequent investigations provide evidence that AHSP acts as a protein-specific molecular chaperone to fold and stabilize a-globin for HbA synthesis [58] and to protect erythroid cells against the deleterious effects of excess free α -Hb [45]. AHSP stabilizes the structure of α -Hb and detoxifies it by inhibiting the ability of heme iron to participate in chemical reactions that generate damaging ROS in RBC [45, 54, 59, 60]. In β thalassemia mice model, loss of AHSP deficiency exacerbates anemia [45]. AHSP^{-/-} mice present mild hemolytic anemia and hemoglobin precipitation in RBCs [45]. AHSP^{-/-} mice exhibited also an elevated proportion of immature erythroid precursors, a maturation arrest, and excess of apoptosis [45]. This effect could also reflect ineffective erythropoiesis as a consequence of excess of free α chains.

The role of *AHSP* in human disease remains an open question. Naturally occurring mutations that ablate *AHSP* expression or alter the protein structure are rare [61, 62]. However, in human studies it was found that quantitative variation in *AHSP* expression between different individuals is extremely common [61]. Causal relationships between decreased *AHSP* expression and severity of thalassemic syndromes have not been established unequivocally [57].

4.5. Role of Heme and Heme Inhibitors in β -Thalassemia Ineffective Erythropoiesis. Excess of α -globin chains are associated with reduced heme production in late erythroid progenitors [35]. How the globin chain imbalance might affect the rate of heme synthesis is still a matter of investigation. The reduction of heme biosynthesis in β -thalassemic erythropoiesis has nevertheless a positive action to prevent the cytotoxic effect of free heme excess. Other cytoprotective mechanisms in response to oxidative stress in β -thalassemic erythroid cells also probably involve PRDX2 protein. PRDX2 is abundantly expressed during β -thalassemic erythropoiesis and binds heme in erythroid precursors, possibly playing an additional role to protect maturing cells by free heme from apoptosis [35].

Another protective factor in β -thalassemic erythropoiesis involves the heme-regulated inhibitor of protein translation, which represses globin translation in heme-deficient erythroid precursors. Heme-regulated inhibitor of protein translation plays a role in murine β -thalassemia, since anemia is more severe in β -thalassemic mice genetically lacking this protein [63, 64]. Roles of heme or heme inhibitors in ineffective erythropoiesis are still not known.

4.6. Role of Inflammatory Cytokines in Ineffective Erythropoiesis in β -Thalassemia Patients. Increased level of several inflammatory cytokines has been reported in β -TM and might contribute to ineffective erythropoiesis, through the well-known mechanism of "anemia associated with a chronic disease."

Further studies have shown an increased of TNF- α concentration in β -TM patients, unrelated to splenectomy [65, 66] or only in the splenectomised patients group [67–69]. In these studies, the authors suggested that the main cause for TNF- α rise was macrophage activation due to iron overload and the antigenic stimulation induced by chronic transfusion therapy.

TNF-α inhibits erythropoiesis in vivo and in vitro [70-80]. However, the mechanism by which TNF- α inhibits erythroid progenitor cells remains unclear. TNF-α induces an increase of apoptosis within the compartment of immature erythroblasts and a decrease in mature erythroblasts. TNFa inhibits directly the BFU-E colony growth [70, 79, 80] whereas inhibition of CFU-E colony growth by the TNF- α is indirect via stimulation of β -interferon production from accessory cells [81, 82]. TNF- α might act directly on the TNF receptor expressed on immature erythroblasts or by inducing ceramide synthesis, lipids component of the cell membrane which can act as a signaling molecule involved in TNFinduced apoptosis. It was also reported that the inhibitory effect of $TNF-\alpha$ on erythroid maturation might be involved in NF- κ B induction [70]. TNF- α cannot only directly inhibit erythroid differentiation but also facilitate proliferation of nonerythroid precursor cells (such as dendritics cells) in chronic disease with inflammatory syndrome [80].

Furthermore, it was described that transforming growth factor- β (TGF- β) plasma level was higher in β -TM splenectomized patients as compared to control group as well as other cytokines from TGF- β superfamily [83]. Therefore, TGF- β is a paradoxical inhibitor of normal erythropoiesis that acts by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors [84]. Its potential role in pathophysiological mechanisms of β -thalassemia ineffective erythropoiesis has not been studied to date.

4.7. Other Pathophysiological Pathways Involved in β-Thalassemia Ineffective Erythropoiesis

4.7.1. Macrophages Number and Activation Are Enhanced. As described above, macrophages number and level of activation are enhanced in bone marrow of β -thalassemic patients [29, 37]. It was suggested that macrophages activation was due to iron overload and antigenic stimulation related to chronic transfusion therapy [83]. Those activated macrophages selectively phagocyte apoptotic erythroblasts exhibiting "eat me signal" [37, 38, 85], thereby contributing to the ineffective erythropoiesis.

It has been demonstrated that thalassemic erythrocytes are phagocytosed by activated macrophages *in vitro* [85], and the mean number of β -thalassemic cells ingested by monocytes was found to be approximatively 30% higher than that for normal monocytes [86]. Mechanisms involved in the recognition of apoptotic erythroblasts by macrophages are not fully understood, but CD36 at the surface of macrophages and phosphatidyl serine residues exposed on apoptotic erythroblasts membrane appear to be involved [37]. Furthermore, oxidant injury that produced a IgG-bound neoantigen band 3, associated to complement, provided signals for macrophages to remove such affected erythroblasts [53]. 4.7.2. Epo Response to Anemia in β -Thalassemia Major. In β -thalassemia, Epo is dramatically increased in response to anemia and hypoxia [87]. Nevertheless, Epo response is blunted as compared with Epo response in aplastic anemia or iron deficiency anemia [88, 89]. Underlying mechanisms for the blunted Epo response in patients with β -TM are not well understood. Three hypotheses are suggested:

- (i) increased capture and faster clearance of Epo by erythroid cells hyperplasia [90],
- (ii) inhibition of Epo renal synthesis by inflammatory cytokines (IL-1α, IL-1β, TGF-β, or TNF-α) [91] as showed in other anemias of chronic disease [92–96] or by impaired renal function [89, 97–101]; very high serum Epo levels were found in young patients with β-TM and β-thalassemia intermedia, comparable to the levels found in patients with aplastic anemia, which were different from the levels found in older thalassemia patients with the same degree of anemia; it is suggested, therefore, that a decrease in serum Epo levels could develop during the course of the disease [102, 103],
- (iii) The low oxygen-Hb affinity and subsequent right shifting of oxygen-Hb dissociation curve would facilitate tissue oxygen availability, decreasing the hypoxic burden to anemia. Both low oxygen-Hb affinity and increased 2,3-diphosphoglycerate levels [104] present in β -TM might induce an inadequate Epo response to a given degree of anemia.

Nevertheless, increased Epo level, secondary to profound anemia, is believed to be the cause of early erythroid progenitors and precursors expansion in β -TM [87]. In β -TM mice model, it was shown that persistent activation of JAK2, as a consequence of high levels of Epo, drives erythroid expansion and extramedullary hematopoiesis, thus might constitute a target, by using JAK2 inhibitors, to treat this complication and decrease transfusion burden [105].

4.7.3. Iron Overload in Thalassemia. Tissue iron overload is the most important complication of β -thalassemia and is a major focus of therapeutic management [42, 106].

Blood transfusion is a comprehensive source of iron loading for β -thalassemia patients. Nevertheless, iron overload occurs also in patients who have not received transfusions such as patients suffering from thalassemia intermedia [42, 107, 108]. Decreased levels of hepcidin in these patients explain this paradoxical feature. Hepcidin is a key regulator of iron homeostasis: it blocks iron release from macrophages and hepatocytes and inhibits intestinal iron absorption. Its liver expression increases in response to iron overload and inflammatory stimuli [4, 109]. If hepcidin expression would be correctly regulated, it should be increased in β thalassemia patients in order to decrease intestinal iron absorption. However, the opposite effect is observed [110, 111]. Indeed, two hepcidin erythroid regulators have been reported: the growth differentiation factor 15 (GDF15) and the twisted gastrulation protein homolog 1 (TWSG1) [112, 113]. High concentrations of both proteins, members of the TGF- β superfamily, were evidenced in β -thalassemia serum compared to normal human serum. These proteins downregulate hepcidin secretion by hepatocytes [112, 114]. GDF15 expression is associated with cellular stress and apoptosis and is expressed at low level during normal erythropoiesis. While β -thalassemic erythroid differentiation, GDF15 has been shown to be secreted by apoptotic erythroid cells at final stages. In contrast, the highest levels of TWSG1 were detected at early stages of erythroblast differentiation, before hemoglobinization [113].

Red blood cell membranes from thalassemic patients carry abnormal deposits of iron, presumed to mediate a variety of oxidative induced membrane dysfunctions. The combination of iron overload and increased outpouring of catabolic iron from the reticuloendothelial system overwhelms the iron-carrying reticuloendothelial system and the iron capacity of transferrin, the main transport protein, to bind and detoxify iron. Non-transferrin-bound fraction of plasma iron might promote the generation of malonyldialdehyde [115] and free hydroxyl radicals, propagators of oxygen-related damage [42, 116, 117]. In addition, several pathobiochemical consequences in thalassemic RBC membranes, such as increased lipid peroxidation and protein thiol oxidation, have been linked to the deposition of generic iron on the cytosolic leaflet of plasma membrane. This mechanism could also contribute to erythroblast apoptosis [118].

It has been shown in mouse model of β -thalassemia intermedia that decreasing iron availability of erythroid cells limits the formation of toxic alpha-chain/heme aggregates and improves ineffective erythropoiesis and anemia [119].

Moreover, it was hypothesized that oral iron chelators, which have an enhanced capacity to penetrate through cell membrane, might be useful in chelating these pathologic iron deposits responsible for ROS generation [118]. This suggestion receives further support from *in vitro* and some *in vivo* studies using these treatments. It was shown that membrane free-iron content decreased as did heme content of RBC membranes from deferiprone-treated thalassemic patients [118]. It has been recently described that deferasirox therapy in β -TM patients is associated with higher levels of circulating erythroid burst-forming unit than controls and other iron chelators [120].

Furthermore, β -TM patients with severe hemochromatosis may develop severe endocrine complications due to iron overload. Hypogonadism, hypothyroidism, and hypoadrenalism may also contribute to anemia. Thus endocrinopathy must be monitored regularly and treated with hormone replacement [121].

4.7.4. Masked Deficit of Folic Acid in Thalassemia. Folic acid deficiency has been reported in both thalassemia major and minor [122–124], as a consequence of increased folate use caused by increased erythropoiesis. It can lead to overestimation of RBC deficiency. Daily folate supplementation is currently advised for patients with hemoglobinopathy [124].

5. Conclusion

The pathophysiological mechanisms of ineffective erythropoiesis in β -thalassemia could be the conjunction of several mechanisms of which the final consequence is the arrest of maturation and increased apoptosis of erythroblasts during their terminal differentiation stage.

Putative actors of ineffective erythropoiesis are suggested to be (1) oxidative stress induced by the excess of α -globin secondary to the α/β globin imbalance, (2) iron overload, and (3) endocrines and cytokine and environmental factors. Key questions still remain to be addressed: how deposition of α -globin chains and/or ROS production in erythroid precursors induce apoptosis and if antiapoptotic processes (involving heat shock protein) in erythroid cells are deficient or overwhelm. In the future it will be critical to decipher the precise role and mechanisms of these components in order to understand the ineffective erythropoiesis in β -thalassemia and to develop new therapeutic strategies based on these potential targets.

Authors' Contribution

J.-A. Ribeil, J.-B. Arlet, G. Courtois, and O. Hermine contributed equally to this work.

References

- D. J. Weatherall, "Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias," *Nature Reviews Genetics*, vol. 2, no. 4, pp. 245–255, 2001.
- [2] E. Khandros, C. S. Thom, J. D'Souza, and M. J. Weiss, "Integrated protein quality-control pathways regulate free α-globin in murine β-thalassemia," *Blood*, vol. 119, no. 22, pp. 5265–5275, 2012.
- [3] E. Khandros and M. J. Weiss, "Protein quality control during erythropoiesis and hemoglobin synthesis," *Hematol*ogy/Oncology Clinics of North America, vol. 24, no. 6, pp. 1071– 1088, 2010.
- [4] D. Rund and E. Rachmilewitz, "β-thalassemia," The New England Journal of Medicine, vol. 353, no. 11, pp. 1135–1146, 2005.
- [5] S. L. Schrier, "Pathophysiology of thalassemia," Current Opinion in Hematology, vol. 9, no. 2, pp. 123–126, 2002.
- [6] F. M. Gill and E. Schwartz, "Free α-globin pool in human bone marrow," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 52, no. 12, pp. 3057–3063, 1973.
- [7] J. R. Shaeffer, "Evidence for soluble a chains as intermediates in hemoglobin synthesis in the rabbit reticulocyte," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 28, no. 4, pp. 647–652, 1967.
- [8] T. Gregory, C. Yu, A. Ma, S. H. Orkin, G. A. Blobel, and M. J. Weiss, "GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-x(L) expression," *Blood*, vol. 94, no. 1, pp. 87–96, 1999.
- [9] Y. Zermati, C. Garrido, S. Amsellem et al., "Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 193, no. 2, pp. 247–254, 2001.
- [10] J. A. Ribeil, Y. Zermati, J. Vandekerckhove et al., "Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1," *Nature*, vol. 445, no. 7123, pp. 102–105, 2007.

The Scientific World Journal

[11] T. D. Allen and T. M. Dexter, "Ultrastructural aspects of ery-

thropoietic differentiation in long-term bone marrow culture," *Differentiation*, vol. 21, no. 2, pp. 86–94, 1982.

- [12] J. A. Chasis and N. Mohandas, "Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis," *Blood*, vol. 112, no. 3, pp. 470–478, 2008.
- [13] J. Fang, M. Menon, W. Kapelle et al., "EPO modulation of cell-cycle regulatory genes, and cell division, in primary bone marrow erythroblasts," *Blood*, vol. 110, no. 7, pp. 2361–2370, 2007.
- [14] M. Socolovsky, M. Murrell, Y. Liu, R. Pop, E. Porpiglia, and A. Levchenko, "Negative autoregulation by FAS mediates robust fetal erythropoiesis," *PLoS Biology*, vol. 5, no. 10, article e252, 2007.
- [15] M. P. Menon, V. Karur, O. Bogacheva, O. Bogachev, B. Cuctara, and D. M. Wojchowski, "Signals for stress erythropoiesis are integrated via an erythropoietin receptor-phosphotyrosine-343-Stat5 axis," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, no. 3, pp. 683–694, 2006.
- [16] M. O. Hengartner, "The biochemistry of apoptosis," *Nature*, vol. 407, no. 6805, pp. 770–776, 2000.
- [17] C. H. Yi and J. Yuan, "The jekyll and hyde functions of caspases," *Developmental Cell*, vol. 16, no. 1, pp. 21–34, 2009.
- [18] R. M. Locksley, N. Killeen, and M. J. Lenardo, "The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology," *Cell*, vol. 104, no. 4, pp. 487–501, 2001.
- [19] S. Orrenius, "Mitochondrial regulation of apoptotic cell death," *Toxicology Letters*, vol. 149, no. 1–3, pp. 19–23, 2004.
- [20] D. R. Green and G. Kroemer, "The pathophysiology of mitochondrial cell death," *Science*, vol. 305, no. 5684, pp. 626–629, 2004.
- [21] R. de Maria, A. Zeuner, A. Eramo et al., "Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1," *Nature*, vol. 401, no. 6752, pp. 489–493, 1999.
- [22] A. Zeuner, A. Eramo, U. Testa et al., "Control of erythroid cell production via caspase-mediated cleavage of transcription factor SCL/Tal-1," *Cell Death and Differentiation*, vol. 10, no. 8, pp. 905–913, 2003.
- [23] R. de Maria, U. Testa, L. Luchetti et al., "Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis," *Blood*, vol. 93, no. 3, pp. 796–803, 1999.
- [24] M. Koulnis, Y. Liu, K. Hallstrom, and M. Socolovsky, "Negative autoregulation by fas stabilizes adult erythropoiesis and accelerates its stress response," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 7, Article ID e21192, 2011.
- [25] U. Testa, "Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis," *Leukemia*, vol. 18, no. 7, pp. 1176–1199, 2004.
- [26] C. A. Finch and P. Sturgeon, "Erythrokinetics in Cooley's anemia," Blood, vol. 12, no. 1, pp. 64–73, 1957.
- [27] P. Pootrakul, P. Sirankapracha, S. Hemsorach et al., "A correlation of erythrokinetics, ineffective erythropoiesis, and erythroid precursor apoptosis in Thai patients with thalassemia," *Blood*, vol. 96, no. 7, pp. 2606–2612, 2000.
- [28] C. A. Finch, K. Deubelbeiss, J. D. Cook et al., "Ferrokinetics in man," *Medicine*, vol. 49, no. 1, pp. 17–53, 1970.
- [29] F. Centis, L. Tabellini, G. Lucarelli et al., "The importance of erythroid expansion in determining the extent of apoptosis in erythroid precursors in patients with β-thalassemia major," *Blood*, vol. 96, no. 10, pp. 3624–3629, 2000.
- [30] J. Yuan, E. Angelucci, G. Lucarelli et al., "Accelerated programmed cell death (apoptosis) in erythroid precursors of patients with severe β-thalassemia (Cooley's anemia)," *Blood*, vol. 82, no. 2, pp. 374–377, 1993.

- [31] S. L. Schrier, "Pathophysiology of the thalassemias the Albion Walter Hewlett Award presentation," Western Journal of Medicine, vol. 167, no. 2, pp. 82–89, 1997.
- [32] L. A. Mathias, T. C. Fisher, L. Zeng et al., "Ineffective erythropoiesis in β-thalassemia major is due to apoptosis at the polychromatophilic normoblast stage," *Experimental Hematology*, vol. 28, no. 12, pp. 1343–1353, 2000.
- [33] S. N. Wickramasinghe and V. Bush, "Observations on the ultrastructure of erythropoietic cells and reticulum cells in the bone marrow of patients with homozygous β thalassaemia," *The British Journal of Haematology*, vol. 30, no. 4, pp. 395–399, 1975.
- [34] A. Leecharoenkiat, T. Wannatung, P. Lithanatudom et al., "Increased oxidative metabolism is associated with erythroid precursor expansion in β0-thalassaemia/Hb E disease," Blood Cells, Molecules and Diseases, vol. 47, no. 3, pp. 143–157, 2011.
- [35] L. de Franceschi, M. Bertoldi, L. de Falco et al., "Oxidative stress modulates heme synthesis and induces peroxiredoxin-2 as a novel cytoprotective response in β-thalassemic erythropoiesis," *Haematologica*, vol. 96, no. 11, pp. 1595–1604, 2011.
- [36] C. Lacombe, J. L. Da Silva, P. Bruneval et al., "Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 81, no. 2, pp. 620– 623, 1988.
- [37] E. Angelucci, H. Bai, F. Centis et al., "Enhanced macrophagic attack on β-thalassemia major erythroid precursors," *Haematologica*, vol. 87, no. 6, pp. 578–583, 2002.
- [38] F. A. Kuypers and K. de Jong, "The role of phosphatidylserine in recognition and removal of erythrocytes," *Cellular and Molecular Biology*, vol. 50, no. 2, pp. 147–158, 2004.
- [39] Y. Liu, R. Pop, C. Sadegh, C. Brugnara, V. H. Haase, and M. Socolovsky, "Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo," *Blood*, vol. 108, no. 1, pp. 123–133, 2006.
- [40] S. L. Schrier, F. Centis, M. Verneris, L. Ma, and E. Angelucci, "The role of oxidant injury in the pathophysiology of human thalassemias," *Redox Report*, vol. 8, no. 5, pp. 241–245, 2003.
- [41] D. G. Nathan and R. B. Gunn, "Thalassemia: the consequences of unbalanced hemoglobin synthesis," *The American Journal of Medicine*, vol. 41, no. 5, pp. 815–830, 1966.
- [42] N. F. Olivieri, "The β-thalassemias," The New England Journal of Medicine, vol. 341, no. 2, pp. 99–109, 1999.
- [43] D. Tavazzi, L. Duca, G. Graziadei, A. Comino, G. Fiorelli, and M. D. Cappellini, "Membrane-bound iron contributes to oxidative damage of β-thalassaemia intermedia erythrocytes," *The British Journal of Haematology*, vol. 112, no. 1, pp. 48–50, 2001.
- [44] A. Bank, "Hemoglobin synthesis in β-thalassemia: the properties of the free alpha-chains," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 47, no. 4, pp. 860–866, 1968.
- [45] Y. Kong, S. Zhou, A. J. Kihm et al., "Loss of α-hemoglobinstabilizing protein impairs erythropoiesis and exacerbates βthalassemia," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 114, no. 10, pp. 1457–1466, 2004.
- [46] E. Shinar and E. A. Rachmilewitz, "Oxidative denaturation of red blood cells in thalassemia," *Seminars in Hematology*, vol. 27, no. 1, pp. 70–82, 1990.
- [47] T. Fujisawa, K. Takeda, and H. Ichijo, "ASK family proteins in stress response and disease," *Molecular Biotechnology*, vol. 37, no. 1, pp. 13–18, 2007.

The Scientific World Journal

- [48] M. L. Circu and T. Y. Aw, "Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 48, no. 6, pp. 749–762, 2010.
- [49] M. Nagata, N. Arimitsu, T. Ito, and K. Sekimizu, "Antioxidant N-acetyl-l-cysteine inhibits erythropoietin-induced differentiation of erythroid progenitors derived from mouse fetal liver," *Cell Biology International*, vol. 31, no. 3, pp. 252–256, 2007.
- [50] S. L. Schrier, E. Rachmilewitz, and N. Mohandas, "Cellular and membrane properties of α and β thalassemic erythrocytes are different: implication for differences in clinical manifestations," *Blood*, vol. 74, no. 6, pp. 2194–2202, 1989.
- [51] R. Advani, S. Sorenson, E. Shinar, W. Lande, E. Rachmilewitz, and S. L. Schrier, "Characterization and comparison of the red blood cell membrane damage in severe human α- and βthalassemia," *Blood*, vol. 79, no. 4, pp. 1058–1063, 1992.
- [52] M. Aljurf, L. Ma, E. Angelucci et al., "Abnormal assembly of membrane proteins in erythroid progenitors of patients with βthalassemia major," *Blood*, vol. 87, no. 5, pp. 2049–2056, 1996.
- [53] J. Yuan, R. Kannan, E. Shinar, E. A. Rachmilewitz, and P. S. Low, "Isolation, characterization, and immunoprecipitation studies of immune complexes from membranes of β-thalassemic erythrocytes," *Blood*, vol. 79, no. 11, pp. 3007–3013, 1992.
- [54] A. J. Kihm, Y. Kong, W. Hong et al., "An abundant erythroid protein that stabilizes free α-haemoglobin," *Nature*, vol. 417, no. 6890, pp. 758–763, 2002.
- [55] C. O. Dos Santos, A. S. S. Duarte, S. T. O. Saad, and F. F. Costa, "Expression of α-hemoglobin stabilizing protein gene during human erythropoiesis," *Experimental Hematology*, vol. 32, no. 2, pp. 157–162, 2004.
- [56] C. O. Dos Santos, L. C. Dore, E. Valentine et al., "An iron responsive element-like stem-loop regulates α-hemoglobinstabilizing protein mRNA," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 40, pp. 26956–26964, 2008.
- [57] M. J. Weiss and C. O. Dos Santos, "Chaperoning erythropoiesis," Blood, vol. 113, no. 10, pp. 2136–2144, 2009.
- [58] X. Yu, Y. Kong, L. C. Dore et al., "An erythroid chaperone that facilitates folding of α-globin subunits for hemoglobin synthesis," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 7, pp. 1856–1865, 2007.
- [59] L. Feng, S. Zhou, L. Gu et al., "Structure of oxidized αhaemoglobin bound to AHSP reveals a protective mechanism for haem," *Nature*, vol. 435, no. 7042, pp. 697–701, 2005.
- [60] S. Zhou, J. S. Olson, M. Fabian, M. J. Weiss, and A. J. Gow, "Biochemical fates of α hemoglobin bound to α hemoglobinstabilizing protein AHSP," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 43, pp. 32611–32618, 2006.
- [61] C. O. Dos Santos, S. Zhou, R. Secolin et al., "Population analysis of the alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) gene identifies sequence variants that alter expression and function," *American Journal of Hematology*, vol. 83, no. 2, pp. 103-108, 2008.
- [62] V. Viprakasit, V. S. Tanphaichitr, W. Chinchang, P. Sangkla, M. J. Weiss, and D. R. Higgs, "Evaluation of α hemoglobin stabilizing protein (AHSP) as a genetic modifier in patients with β thalassemia," *Blood*, vol. 103, no. 9, pp. 3296–3299, 2004.
- [63] A. P. Han, M. D. Fleming, and J. J. Chen, "Heme-regulated eIF2α kinase modifies the phenotypic severity of murine models of erythropoietic protoporphyria and β-thalassemia," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 115, no. 6, pp. 1562–1570, 2005.
- [64] J. J. Chen, "Regulation of protein synthesis by the hemeregulated eIF2α kinase: relevance to anemias," *Blood*, vol. 109, no. 7, pp. 2693–2699, 2007.

- [65] G. Lombardi, R. Matera, M. M. Minervini et al., "Serum levels of cytokines and soluble antigens in polytransfused patients with β-thalassemia major: relationship to immune status," *Haematologica*, vol. 79, no. 5, pp. 406–412, 1994.
- [66] R. Meliconi, M. Uguccioni, E. Lalli et al., "Increased serum concentrations of tumour necrosis factor in β thalassaemia: effect of bone marrow transplantation," *Journal of Clinical Pathology*, vol. 45, no. 1, pp. 61–65, 1992.
- [67] S. Chuncharunee, N. Archararit, P. Hathirat, U. Udomsubpayakul, and V. Atichartakarn, "Levels of serum interleukin-6 and tumor necrosis factor in postsplenectomized thalassemic patients," *Journal of the Medical Association of Thailand*, vol. 80, supplement 1, pp. S86–S90, 1997.
- [68] M. Gharagozloo, M. Karimi, and Z. Amirghofran, "Doublefaced cell-mediated immunity in β-thalassemia major: stimulated phenotype versus suppressed activity," *Annals of Hematol*ogy, vol. 88, no. 1, pp. 21–27, 2009.
- [69] G. C. Del Vecchio, F. Schettini, L. Piacente, A. De Santis, P. Giordano, and D. de Mattia, "Effects of deferiprone on immune status and cytokine pattern in thalassaemia major," *Acta Haematologica*, vol. 108, no. 3, pp. 144–149, 2002.
- [70] W. Xiao, K. Koizumi, M. Nishio et al., "Tumor necrosis factorα inhibits generation of glycophorin A⁺ cells by CD34⁺ cells," *Experimental Hematology*, vol. 30, no. 11, pp. 1238–1247, 2002.
- [71] G. D. Roodman, A. Bird, D. Hutzler, and W. Montgomery, "Tumor necrosis factor-alpha and hematopoietic progenitors: effects of tumor necrosis factor on the growth of erythroid progenitors CFU-E and BFU-E and the hematopoietic cell lines K562, HL60, and HEL cells," *Experimental Hematology*, vol. 15, no. 9, pp. 928–935, 1987.
- [72] R. A. Johnson, T. A. Waddelow, J. Caro, A. Oliff, and G. D. Roodman, "Chronic exposure to tumor necrosis factor in vivo preferentially inhibits erythropoiesis in nude mice," *Blood*, vol. 74, no. 1, pp. 130–138, 1989.
- [73] H. E. Broxmeyer, D. E. Williams, L. Lu et al., "The suppressive influences of human tumor necrosis factors on bone marrow hematopoietic progenitor cells from normal donors and patients with leukemia: synergism of tumor necrosis factor and interferon-γ," *Journal of Immunology*, vol. 136, no. 12, pp. 4487– 4495, 1986.
- [74] T. Murase, T. Hotta, H. Saito, and R. Ohno, "Effect of recombinant human tumor necrosis factor on the colony growth of human leukemia progenitor cells and normal hematopoietic progenitor cells," *Blood*, vol. 69, no. 2, pp. 467–472, 1987.
- [75] B. Backx, L. Broeders, F. J. Bot, and B. Löwenberg, "Positive and negative effects of tumor necrosis factor on colony growth from highly purified normal marrow progenitors," *Leukemia*, vol. 5, no. 1, pp. 66–70, 1991.
- [76] L. S. Rusten and S. E. W. Jacobsen, "Tumor necrosis factor (TNF)-α directly inhibits human erythropoiesis in vitro: role of p55 and p75 TNF receptors," *Blood*, vol. 85, no. 4, pp. 989–996, 1995.
- [77] M. Blick, S. A. Sherwin, M. Rosenblum, and J. Gutterman, "Phase I study of recombinant tumor necrosis factor in cancer patients," *Cancer Research*, vol. 47, no. 11, pp. 2986–2989, 1987.
- [78] H. A. Papadaki, H. D. Kritikos, V. Valatas, D. T. Boumpas, and G. D. Eliopoulos, "Anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis is associated with increased apoptosis of bone marrow erythroid cells: improvement following anti-tumor necrosis factor-α antibody therapy," *Blood*, vol. 100, no. 2, pp. 474–482, 2002.

- [79] X. F. Li, J. Anderson, D. Hutzler, and G. D. Roodman, "Hemininduced erythroid differentiation changes the sensitivity of K562 cells to tumor necrosis factor-a," *Experimental Hematol*ogy, vol. 17, no. 11, pp. 1059–1062, 1989.
- [80] H. Fukaya, W. Xiao, K. Inaba et al., "Codevelopment of dendritic cells along with erythroid differentiation from human CD34⁺ cells by tumor necrosis factor-α," *Experimental Hematology*, vol. 32, no. 5, pp. 450–460, 2004.
- [81] R. T. Means Jr., E. N. Dessypris, and S. B. Krantz, "Inhibition of human colony-forming-unit erythroid by tumor necrosis factor requires accessory cells," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 86, no. 2, pp. 538–541, 1990.
- [82] R. T. Means Jr. and S. B. Krantz, "Inhibition of human erythroid colony-forming units by tumor necrosis factor requires β interferon," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 91, no. 2, pp. 416–419, 1993.
- [83] G. R. Moshtaghi-Kashanian, A. Gholamhoseinian, A. Hoseinimoghadam, and S. Rajabalian, "Splenectomy changes the pattern of cytokine production in β-thalassemic patients," *Cytokine*, vol. 35, no. 5-6, pp. 253–257, 2006.
- [84] Y. Zermati, B. Varet, and O. Hermine, "TGF-β1 drives and accelerates erythroid differentiation in the epo-dependent UT-7 cell line even in the absence of erythropoietin," *Experimental Hematology*, vol. 28, no. 3, pp. 256–266, 2000.
- [85] A. Knyszynski, D. Danon, I. Kahane, and E. A. Rachmilewitz, "Phagocytosis of nucleated and mature β thalassaemic red blood cells by mouse macrophages in vitro," *The British Journal* of Haematology, vol. 43, no. 2, pp. 251–255, 1979.
- [86] W. Wanachiwanawin, U. Siripanyphinyo, S. Fucharoen et al., "Activation of monocytes for the immune clearance of red cells in β(o)-thalassaemia/HbE," *The British Journal of Haematology*, vol. 85, no. 4, pp. 773–777, 1993.
- [87] Y. Ginzburg and S. Rivella, "β-thalassemia: a model for elucidating the dynamic regulation of ineffective erythropoiesis and iron metabolism," *Blood*, vol. 118, no. 16, pp. 4321–4330, 2011.
- [88] M. Cazzola, R. Guarnone, P. Cerani, E. Centenara, A. Rovati, and Y. Beguin, "Red blood cell precursor mass as an independent determinant of serum erythropoietin level," *Blood*, vol. 91, no. 6, pp. 2139–2145, 1998.
- [89] J. S. Chen, K. H. Lin, S. T. Wang, C. J. Tsao, and T. F. Yeh, "Blunted serum erythropoietin response to anemia in patients polytransfused for β-thalassemia major," *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, vol. 20, no. 2, pp. 140–144, 1998.
- [90] C. Camaschella, S. Gonetta, R. Calabrese et al., "Serum erythropoietin and circulating transferrin receptor in thalassemia intermedia patients with heterogeneous genotypes," *Haematologica*, vol. 81, no. 5, pp. 397–403, 1996.
- [91] W. C. Faquin, T. J. Schneider, and M. A. Goldberg, "Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production," *Blood*, vol. 79, no. 8, pp. 1987–1994, 1992.
- [92] M. C. Hochberg, C. M. Arnold, B. B. Hogans, and J. L. Spivak, "Serum immunoreactive erythropoietin in rheumatoid arthritis: impaired response to anemia," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 31, no. 10, pp. 1318–1321, 1988.
- [93] C. B. Miller, R. J. Jones, S. Piantadosi, M. D. Abeloff, and J. L. Spivak, "Decreased erythropoietin response in patients with the anemia of cancer," *The New England Journal of Medicine*, vol. 322, no. 24, pp. 1689–1692, 1990.
- [94] A. N. Baer, E. N. Dessypris, E. Goldwasser, and S. B. Krantz, "Blunted erythropoietin response to anaemia in rheumatoid arthritis," *The British Journal of Haematology*, vol. 66, no. 4, pp. 559–564, 1987.

- [95] H. Johannsen, W. Jelkmann, G. Wiedemann, M. Otte, and T. Wagner, "Erythropoietin/haemoglobin relationship in leukaemia and ulcerative colitis," *European Journal of Haematology*, vol. 43, no. 3, pp. 201–206, 1989.
- [96] J. L. Spivak, D. C. Barnes, E. Fuchs, and T. C. Quinn, "Serum immunoreactive erythropoietin in HIV-infected patients," *The Journal of the American Medical Association*, vol. 261, no. 21, pp. 3104–3107, 1989.
- [97] A. Sumboonnanonda, P. Malasit, V. S. Tanphaichitr et al., "Renal tubular function in β-thalassemia," *Pediatric Nephrology*, vol. 12, no. 4, pp. 280–283, 1998.
- [98] B. Aldudak, A. K. Bayazit, A. Noyan et al., "Renal function in pediatric patients with β-thalassemia major," *Pediatric Nephrol*ogy, vol. 15, no. 1-2, pp. 109–112, 2000.
- [99] P. Cianciulli, D. Sollecito, F. Sorrentino et al., "Early detection of nephrotoxic effects in thalassemic patients receiving desferrioxamine therapy," *Kidney International*, vol. 46, no. 2, pp. 467–470, 1994.
- [100] B. H. Landing, H. C. Gonick, R. L. Nadorra et al., "Renal lesions and clinical findings in thalassemia major and other chronic anemias with hemosiderosis," *Pediatric Pathology*, vol. 9, no. 5, pp. 479–500, 1989.
- [101] V. Smolkin, R. Halevy, C. Levin et al., "Renal function in children with β-thalassemia major and thalassemia intermedia," *Pediatric Nephrology*, vol. 23, no. 10, pp. 1847–1851, 2008.
- [102] D. Manor, E. Fibach, A. Goldfarb, and E. A. Rachmilewitz, "Erythropoietin activity in the serum of β thalassemic patients," *Scandinavian Journal of Haematology*, vol. 37, no. 3, pp. 221–228, 1986.
- [103] E. A. Rachmilewitz and M. Aker, "The role of recombinant human erythropoietin in the treatment of thalassemia," Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 850, pp. 129–138, 1998.
- [104] G. Ricci, G. Castaldi, G. Zavagli, G. Lupi, A. Turati, and T. Bezzi, "Red cell 2,3-diphosphoglycerate contents and oxygen affinity in heterozygous β-thalassaemia," Acta Haematologica, vol. 68, no. 1, pp. 63–64, 1982.
- [105] I. V. Libani, E. C. Guy, L. Melchiori et al., "Decreased differentiation of erythroid cells exacerbates ineffective erythropoiesis in β-thalassemia," *Blood*, vol. 112, no. 3, pp. 875–885, 2008.
- [106] N. F. Olivieri and G. M. Brittenham, "Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia," *Blood*, vol. 89, no. 3, pp. 739– 761, 1997.
- [107] M. J. Pippard, S. T. Callender, G. T. Warner, and D. J. Weatherall, "Iron absorption and loading in β-thalassaemia intermedia," *The Lancet*, vol. 2, no. 8147, pp. 819–821, 1979.
- [108] P. Pootrakul, K. Kitcharoen, P. Yansukon et al., "The effect of erythroid hyperplasia on iron balance," *Blood*, vol. 71, no. 4, pp. 1124–1129, 1988.
- [109] T. Ganz, "Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation," *Blood*, vol. 102, no. 3, pp. 783–788, 2003.
- [110] G. Papanikolaou, M. Tzilianos, J. I. Christakis et al., "Hepcidin in iron overload disorders," *Blood*, vol. 105, no. 10, pp. 4103–4105, 2005.
- [111] A. Kattamis, I. Papassotiriou, D. Palaiologou et al., "The effects of erythropoetic activity and iron burden on hepcidin expression in patients with thalassemia major," *Haematologica*, vol. 91, no. 6, pp. 809–812, 2006.
- [112] T. Tanno, N. V. Bhanu, P. A. Oneal et al., "High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin," *Nature Medicine*, vol. 13, no. 9, pp. 1096–1101, 2007.

10

The Scientific World Journal

- [113] T. Tanno, P. Porayette, O. Sripichai et al., "Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells," *Blood*, vol. 114, no. 1, pp. 181–186, 2009.
- [114] J. Kanda, C. Mizumoto, H. Kawabata et al., "Serum hepcidin level and erythropoietic activity after hematopoietic stem cell transplantation," *Haematologica*, vol. 93, no. 10, pp. 1550–1554, 2008.
- [115] G. Cighetti, L. Duca, L. Bortone et al., "Oxidative status and malondialdehyde in β-thalassaemia patients," *European Journal* of Clinical Investigation, vol. 32, supplement 1, pp. 55–60, 2002.
- [116] C. Hershko and D. J. Weatherall, "Iron-chelating therapy," *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, vol. 26, no. 4, pp. 303–345, 1988.
- [117] C. Hershko, A. M. Konijn, and G. Link, "Iron chelators for thalassaemia," *The British Journal of Haematology*, vol. 101, no. 3, pp. 399–406, 1998.
- [118] O. Shalev, T. Repka, A. Goldfarb et al., "Deferiprone (L1) chelates pathologic iron deposits from membranes of intact thalassemic and sickle red blood cells both in vitro and in vivo," *Blood*, vol. 86, no. 5, pp. 2008–2013, 1995.
- [119] H. Li, A. C. Rybicki, S. M. Suzuka et al., "Transferrin therapy ameliorates disease in beta-thalassemic mice," *Nature Medicine*, vol. 16, no. 2, pp. 177–182, 2010.
- [120] G. L. Forni, M. Podesta', M. Musso et al., "Differential effects of the type of iron chelator on the absolute number of hematopoietic peripheral progenitors in patients with β-thalassemia major," *Haematologica*, 2012.
- [121] D. Tiosano and Z. Hochberg, "Endocrine complications of thalassemia," *Journal of Endocrinological Investigation*, vol. 24, no. 9, pp. 716–723, 2001.
- [122] P. Danel, R. Girot, and G. Tchernia, "Thalassemia major presenting as megaloblastic anemia with folate deficiency," *Archives Francaises de Pediatrie*, vol. 40, no. 10, pp. 799–801, 1983.
- [123] F. Ortuño, A. Remacha, S. Martin, J. Soler, and E. Gimferrer, "Prevalence of folate deficiency in β and delta-beta heterozygous thalassemia," *Haematologica*, vol. 75, no. 6, article 585, 1990.
- [124] A. Mazzone, M. Vezzoli, and E. Ottini, "Masked deficit of B12 and folic acid in thalassemia," *American Journal of Hematology*, vol. 67, no. 4, article 274, 2001.

ANNEXE 2 : Autres articles sur le sujet

1. Frisan E, Vandekerckhove J, De Thonel A, Pierre-Eugène C, Sternberg A, <u>Arlet J-B</u>, et al. Defective nuclear localization of Hsp70 is associated with dyserythropoiesis and GATA-1 cleavage in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2012;119:1532-1542.

2. Michael Dussiot, Thiago Trovati Maciel, Aurélie Fricot, Joel Veiga, Etienne Paubelle, Céline Chartier, Emmanuel Payen, Yves Beuzard, Jean-Antoine Ribeil, Jean-Benoit Arlet, Francine Coté, Geneviève Courtois, Thomas O. Daniel, Rajesh Chopra, Victoria Sung, Olivier Hermine and Ivan Cruz Moura. Inhibition of ActRIIa by sotatercept improves anemia and corrects ineffective erythropoiesis in β-thalassemia. *Nature Medicine*. In Review. 2013.

ANNEXE 3 : Présentation à des congrès. Prix

Communications orales

- <u>Arlet JB</u>, JA Ribeil et al. Heat shock protein 70 cytosolic sequestration by excess of free α globin chains is a key mechanism of the ineffective eryhtropoiesis in β-thalassemia major. **54**th annual congress of American society of hematology. Atlanta (USA). 11 décembre 2012.
- <u>Arlet JB</u>, Ribeil JA, Hazoume A, Negre O, Garrido C, Courtois G, Hermine O. Rôle d'Hsp-70 dans l'érythropoïèse inefficace des β-thalassémies majeures. **Congrès de la SNFMI** (société nationale Française de médecine interne. Clermont-Ferrand. 6 Juin 2012. Rev Med Interne 2012 ;33 :S57.
- 3. <u>Arlet JB</u>. Rôle d'Hsp-70 dans l'érythropoïèse inefficace des β-thalassémies majeures. **Journées de l'école doctorale Paris 11**. Roscoff. 9 mai 2012
- <u>Arlet JB</u>, Ribeil JA, Hazoume A, Negre O, Garrido C, Courtois G, Hermine O. Rôle d'Hsp-70 dans l'érythropoïèse inefficace des β-thalassémies majeures. **Congrès de la SFH** (société Française d'Hématologie. 22 mars 2012. Hématologie 2012 ;18S1 :49. **Prix de la SFH**, **meilleure communication** orale 2012.

Communications affichées

 <u>Arlet JB</u>, JA Ribeil, Coutois G, Hermine O. Cytoplasmic sequestration of Hsp70 by excess of free α globin chains promotes ineffective erythropoiesis in β-thalassemia major. European iron overload workshop. Monaco 16-17 mars 2013. **Premier prix de la compétition des posters.**

BIBLIOGRAPHIE

1. Advani R, Sorenson S, Shinar E, et al. Characterization and comparison of the red blood cell membrane damage in severe human alpha- and beta-thalassemia. *Blood*. 1992;79(4):1058-1063.

2. Aggeli C, Antoniades C, Cosma C, et al. Endothelial dysfunction and inflammatory process in transfusion-dependent patients with beta-thalassemia major. *Int. J. Cardiol.* 2005;105(1):80-84.

3. Akel S, Petrow-Sadowski C, Laughlin MJ, Ruscetti FW. Neutralization of Autocrine Transforming Growth Factor- β in Human Cord Blood CD34+CD38-Lin- Cells Promotes Stem-Cell-Factor-Mediated Erythropoietin-Independent Early Erythroid Progenitor Development and Reduces Terminal Differentiation. *Stem Cells*. 2003;21(5):557–567.

4. Aldudak B, Karabay Bayazit A, Noyan A, et al. Renal function in pediatric patients with beta-thalassemia major. *Pediatr. Nephrol.* 2000;15(1-2):109-112.

5. Aljurf M, Ma L, Angelucci E, et al. Abnormal assembly of membrane proteins in erythroid progenitors of patients with beta-thalassemia major. *Blood*. 1996;87(5):2049-2056.

6. Angelucci E, Bai H, Centis F, et al. Enhanced macrophagic attack on beta-thalassemia major erythroid precursors. *Haematologica*. 2002;87(6):578-583.

7. Aridon P, Geraci F, Turturici G, et al. Protective role of heat shock proteins in Parkinson's disease. *Neurodegener Dis.* 2011;8(4):155-168.

8. Banerji SS, Laing K, Morimoto RI. Erythroid lineage-specific expression and inducibility of the major heat shock protein HSP70 during avian embryogenesis. *Genes Dev.* 1987;1(9):946-953.

9. Batcho PF, Case DA, Schlick T. Optimized particle-mesh Ewald/multiple-time step integration for molecular dynamics simulations. *Journal of chemical physics*. 2001;115(9):4003-4018.

10. Beere HM, Wolf BB, Cain K, et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol.* 2000;2(8):469-475.

11. Bensaude O, Babinet C, Morange M, Jacob F. Heat shock proteins, first major products of zygotic gene activity in mouse embryo. *Nature*. 1983;305(5932):331-333.

12. Berman HM, Bhat TN, Bourne PE, et al. The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics. *Nat. Struct. Biol.* 2000;7 Suppl:957-959.

13. Bhanu NV, Trice TA, Lee YT, et al. A sustained and pancellular reversal of gamma-globin gene silencing in adult human erythroid precursor cells. *Blood*. 2005;105(1):387-393.

14. Bhattacharya D, Saha S, Basu S, et al. Differential regulation of redox proteins and chaperones in HbEβ-thalassemia erythrocyte proteome. *Proteomics Clin Appl*. 2010;4(5):480-488.

15. Blau CA, Constantoulakis P, Shaw CM, Stamatoyannopoulos G. Fetal hemoglobin induction with butyric acid: efficacy and toxicity. *Blood*. 1993;81(2):529-537.

16. Böhmer RM. IL-3-dependent early erythropoiesis is stimulated by autocrine transforming growth factor beta. *Stem Cells*. 2004;22(2):216-224.

17. Bonanou-Tzedaki SA, Sohi M, Arnstein HR. Regulation of erythroid cell differentiation by haemin. *Cell Differ.* 1981;10(5):267-279.

18. Bornman L, Rossouw H, Gericke GS, Polla BS. Effects of iron deprivation on the pathology and stress protein expression in murine X-linked muscular dystrophy. *Biochem. Pharmacol.* 1998;56(6):751-757.

19. Borsook H, Lingrel JB, Scaro JL, Millette RL. Synthesis of haemoglobin in relation to the maturation of erythroid cells. *Nature*. 1962;196:347-350.

20. Boyer SH, Belding TK, Margolet L, Noyes AN. Fetal hemoglobin restriction to a few erythrocytes (F cells) in normal human adults. *Science*. 1975;188(4186):361-363.

21. Brierley-Hobson S. Binding of (-)-epigallocatechin-3-gallate to the Hsp70 ATPase domain may promote apoptosis in colorectal cancer. *Bioscience Horizons*. 2008;1(1):9-18.

22. Broadley SA, Hartl FU. The role of molecular chaperones in human misfolding diseases. *FEBS Letters*. 2009;583(16):2647-2653.

23. Brocchieri L, Conway de Macario E, Macario AJL. Hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evol. Biol.* 2008;8:19.

24. Broers JLV, Bronnenberg NMHJ, Kuijpers HJH, et al. Partial cleavage of A-type lamins concurs with their total disintegration from the nuclear lamina during apoptosis. *Eur. J. Cell Biol.* 2002;81(12):677-691.

25. Brooks BR, Brooks CL 3rd, Mackerell AD Jr, et al. CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem*. 2009;30(10):1545-1614.

26. Broudy VC, Lin N, Brice M, Nakamoto B, Papayannopoulou T. Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood*. 1991;77(12):2583-2590.

27. Buck I, Morceau F, Cristofanon S, et al. The inhibitory effect of the proinflammatory cytokine TNFalpha on erythroid differentiation involves erythroid transcription factor modulation. *Int. J. Oncol.* 2009;34(3):853-860.

28. Burmester T, Hankeln T. What is the function of neuroglobin? *J Exp Biol.* 2009;212(10):1423-1428.

29. Buzzard KA, Giaccia AJ, Killender M, Anderson RL. Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1998;273(27):17147-17153.

30. Camaschella C, Gonella S, Calabrese R, et al. Serum erythropoietin and circulating transferrin receptor in thalassemia intermedia patients with heterogeneous genotypes. *Haematologica*. 1996;81(5):397-403.

31. Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. Genet. Med. 2010;12(2):61-76.

32. Carlile GW, Smith DH, Wiedmann M. Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood*. 2004;103(11):4310-4316.

33. Carlile GW, Smith DH, Wiedmann M. A non-apoptotic role for Fas/FasL in erythropoiesis. *FEBS Lett.* 2009;583(4):848-854.

34. Cazzola M, Guarnone R, Cerani P, et al. Red blood cell precursor mass as an independent determinant of serum erythropoietin level. *Blood*. 1998;91(6):2139-2145.

35. Centis F, Tabellini L, Lucarelli G, et al. The importance of erythroid expansion in determining the extent of apoptosis in erythroid precursors in patients with β -thalassemia major. *Blood*. 2000;96(10):3624-3629.

36. Chen JS, Lin KH, Wang ST, Tsao CJ, Yeh TF. Blunted serum erythropoietin response to anemia in patients polytransfused for beta-thalassemia major. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 1998;20(2):140-144.

37. Chen J-J. Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2 α kinase: relevance to anemias. *Blood*. 2007;109(7):2693-2699.

38. Chen R, Li L, Weng Z. ZDOCK: an initial-stage protein-docking algorithm. *Proteins*. 2003;52(1):80-87.

39. Chuang J-Y, Lee C-W, Shih Y-H, et al. Interactions between amyloid- β and hemoglobin: implications for amyloid plaque formation in Alzheimer's disease. *PLoS ONE*. 2012;7(3):e33120.

40. Chuncharunee S, Archararit N, Hathirat P, Udomsubpayakul U, Atichartakarn V. Levels of serum interleukin-6 and tumor necrosis factor in postsplenectomized thalassemic patients. *J Med Assoc Thai*. 1997;80 Suppl 1:S86-91.

41. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular derox systems and apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2010;48(6):749-762.

42. Dai CH, Price JO, Brunner T, Krantz SB. Fas ligand is present in human erythroid colony-forming cells and interacts with Fas induced by interferon gamma to produce erythroid cell apoptosis. *Blood*. 1998;91(4):1235-1242.

43. Dallalio G, North M, Worden BD, Means RT Jr. Inhibition of human erythroid colony formation by ceramide. *Exp. Hematol.* 1999;27(7):1133-1138.

44. De Thonel A, Vandekerckhove J, Lanneau D, et al. HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation. *Blood*. 2010;116(1):85-96.

45. De Franceschi L, Ronzoni L, Cappellini MD, et al. K-CL co-transport plays an important role in normal and beta thalassemic erythropoiesis. *Haematologica*. 2007;92(10):1319-1326.

46. De Franceschi L, Bertoldi M, De Falco L, et al. Oxidative stress modulates heme synthesis and induces peroxiredoxin-2 as a novel cytoprotective response in β -thalassemic erythropoiesis. *Haematologica*. 2011;96(11):1595-1604.

47. De Maria R, Testa U, Luchetti L, et al. Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood*. 1999;93(3):796-803.

48. De Maria R, Zeuner A, Eramo A, et al. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*. 1999;401(6752):489-493.

49. Del Vecchio GC, Schettini F, Piacente L, et al. Effects of deferiprone on immune status and cytokine pattern in thalassaemia major. *Acta Haematol.* 2002;108(3):144-149.

50. DeLano WL. In: *The PyMOL Molecular Graphics System*. Delano Scientific, San Carlos, USA.; 2002.

51. Dos Santos CO, Duarte ASS, Saad STO, Costa FF. Expression of alpha-hemoglobin stabilizing protein gene during human erythropoiesis. *Exp. Hematol.* 2004;32(2):157-162.

52. Dos Santos CO, Zhou S, Secolin R, et al. Population analysis of the alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) gene identifies sequence variants that alter expression and function. *Am. J. Hematol.* 2008;83(2):103-108.

53. Dover GJ, Boyer SH. Fetal hemoglobin-containing cells have the same mean corpuscular hemoglobin as cells without fetal hemoglobin: a reciprocal relationship between gamma- and beta-globin gene expression in normal subjects and in those with high fetal hemoglobin production. *Blood*. 1987;69(4):1109-1113.

54. Ellis RJ, Van der Vies SM, Hemmingsen SM. The molecular chaperone concept. *Biochem. Soc. Symp.* 1989;55:145-153.

55. Ema H, Nakauchi H. Self-renewal and lineage restriction of hematopoietic stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2003;13(5):508-512.

56. Emekli U, Schneidman-Duhovny D, Wolfson HJ, Nussinov R, Haliloglu T. HingeProt: automated prediction of hinges in protein structures. *Proteins*. 2008;70(4):1219-1227.

57. Eswar N, John B, Mirkovic N, et al. Tools for comparative protein structure modeling and analysis. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3375-3380.

58. Evans T, Reitman M, Felsenfeld G. An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988;85(16):5976-5980.

59. Faquin WC, Schneider TJ, Goldberg MA. Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production. *Blood*. 1992;79(8):1987-1994.

60. Fernández-Morales B, Pavón L, Calés C. CDC6 expression is regulated by lineage-specific transcription factor GATA1. *Cell Cycle*. 2012;11(16):3055-3066.

61. Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S. GATA1 Function, a Paradigm for Transcription Factors in Hematopoiesis. *Mol. Cell. Biol.* 2005;25(4):1215-1227.

62. Finch CA, Sturgeon P. Erythrokinetics in Cooley's anemia. *Blood*. 1957;12(1):64-73.

63. Finch CA, Deubelbeiss K, Cook JD, et al. Ferrokinetics in man. *Medicine (Baltimore)*. 1970;49(1):17-53.

64. Forni GL, Podestà M, Musso M, et al. Differential effects of the type of iron chelator on the absolute number of hematopoietic peripheral progenitors in patients with β -thalassemia major. *Haematologica*. 2013;98(4):555-559.

65. Friedman AD, Linch DC, Miller B, et al. Determination of the hemoglobin F program in human progenitor-derived erythroid cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1985;75(4):1359-1368.

66. Frisan E, Vandekerckhove J, De Thonel A, et al. Defective nuclear localization of Hsp70 is associated with dyserythropoiesis and GATA-1 cleavage in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;119(6):1532-1542.

67. Fujisawa T, Takeda K, Ichijo H. ASK family proteins in stress response and disease. *Mol. Biotechnol.* 2007;37(1):13-18.

68. Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996;93(22):12355-12358.

69. Fukaya H, Xiao W, Inaba K, et al. Codevelopment of dendritic cells along with erythroid differentiation from human CD34(+) cells by tumor necrosis factor-alpha. *Exp. Hematol.* 2004;32(5):450-460.

70. Gabbianelli M, Morsilli O, Massa A, et al. Effective erythropoiesis and HbF reactivation induced by kit ligand in β -thalassemia. *Blood*. 2008;111(1):421-429.

71. Gabbianelli M, Testa U. Role of Stem Cell Factor in the Reactivation of Human Fetal Hemoglobin. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2009;1(1).

72. Gabet A-S, Coulon S, Fricot A, et al. Caspase-activated ROCK-1 allows erythroblast terminal maturation independently of cytokine-induced Rho signaling. *Cell Death Differ.* 2011;18(4):678-689.

73. Gao X-C, Zhou C-J, Zhou Z-R, et al. The C-terminal helices of heat shock protein 70 are essential for J-domain binding and ATPase activation. *J. Biol. Chem.* 2012;287(8):6044-6052.

74. Garrido C, Brunet M, Didelot C, et al. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle*. 2006;5(22):2592-2601.

75. Gehrig SM, Van der Poel C, Sayer TA, et al. Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy. *Nature*. 2012;484(7394):394-398.

76. Gell D, Kong Y, Eaton SA, Weiss MJ, Mackay JP. Biophysical characterization of the alpha-globin binding protein alpha-hemoglobin stabilizing protein. *J. Biol. Chem.* 2002;277(43):40602-40609.

77. Gharagozloo M, Karimi M, Amirghofran Z. Double-faced cell-mediated immunity in beta-thalassemia major: stimulated phenotype versus suppressed activity. *Ann. Hematol.* 2009;88(1):21-27.

78. Ginzburg Y, Rivella S. β -thalassemia: a model for elucidating the dynamic regulation of ineffective erythropoiesis and iron metabolism. *Blood*. 2011;118(16):4321-4330.

79. Göbel F, Taschner S, Jurkin J, et al. Reciprocal role of GATA-1 and vitamin D receptor in human myeloid dendritic cell differentiation. *Blood*. 2009;114(18):3813-3821.

80. Gong QH, Stern J, Dean A. Transcriptional role of a conserved GATA-1 site in the human epsilonglobin gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* 1991;11(5):2558-2566.

81. Gorman AM, Heavey B, Creagh E, Cotter TG, Samali A. Antioxidant-mediated inhibition of the heat shock response leads to apoptosis. *FEBS Lett.* 1999;445(1):98-102.

82. Gregory CJ, Eaves AC. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood*. 1978;51(3):527-537.

83. Gregoli PA, Bondurant MC. The Roles of Bcl-XL and Apopain in the Control of Erythropoiesis by Erythropoietin. *Blood*. 1997;90(2):630-640.

84. Gregoli PA, Bondurant MC. Function of caspases in regulating apoptosis caused by erythropoietin deprivation in erythroid progenitors. *J. Cell. Physiol.* 1999;178(2):133-143.

85. Gregory T, Yu C, Ma A, et al. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood*. 1999;94(1):87-96.

86. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. 2011;475(7356):324-332.

87. Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G. Thalassaemia. Lancet. 2012;379(9813):373-383.

88. Hino M, Tojo A, Miyazono K, Urabe A, Takaku F. Effects of type beta transforming growth factors on haematopoietic progenitor cells. *Br. J. Haematol.* 1988;70(2):143-147.

89. Horos R, IJspeert H, Pospisilova D, et al. Ribosomal deficiencies in Diamond-Blackfan anemia impair translation of transcripts essential for differentiation of murine and human erythroblasts. *Blood*. 2012;119(1):262-272.

90. Hristoskova S, Holzgreve W, Hahn S. More than one-half of the erythroblasts in the fetal circulation and cord blood are TUNEL positive. *Clin. Chem.* 2001;47(10):1870-1871.

91. Hristoskova S, Holzgreve W, Hahn S. Fetal nucleated erythrocytes in maternal circulation do not display a classic membrane-associated apoptotic characteristic (phosphatidylserine exposure) despite being positive by terminal dUTP nuclear end labeling. *Clin. Chem.* 2003;49(11):1934-1937.

92. Hristoskova S, Holzgreve W, Hahn S, Rusterholz C. Human mature erythroblasts are resistant to apoptosis. *Experimental Cell Research*. 2007;313(5):1024-1032.

93. Jiang J, Maes EG, Taylor AB, et al. Structural basis of J cochaperone binding and regulation of Hsp70. *Mol. Cell*. 2007;28(3):422-433.

94. Kaneko H, Shimizu R, Yamamoto M. GATA factor switching during erythroid differentiation. *Curr. Opin. Hematol.* 2010;17(3):163-168.

95. Kattamis A, Papassotiriou I, Palaiologou D, et al. The effects of erythropoetic activity and iron burden on hepcidin expression in patients with thalassemia major. *Haematologica*. 2006;91(6):809-812.

96. Kendrew JC, Bodo G, Dintzis HM, et al. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature*. 1958;181(4610):662-666.

97. Khandros E, Weiss MJ. Protein Quality Control During Erythropoiesis and Hemoglobin Synthesis. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2010;24(6):1071-1088.

98. Khandros E, Mollan TL, Yu X, et al. Insights into Hemoglobin Assembly through in Vivo Mutagenesis of α -Hemoglobin Stabilizing Protein. *J. Biol. Chem.* 2012;287(14):11325-11337.

99. Kihm AJ, Kong Y, Hong W, et al. An abundant erythroid protein that stabilizes free alpha-haemoglobin. *Nature*. 2002;417(6890):758-763.

100. Kim S-I, Bresnick EH. Transcriptional control of erythropoiesis: emerging mechanisms and principles. *Oncogene*. 2007;26(47):6777-6794.

101. Knyszynski A, Danon D, Kahane I, Rachmilewitz EA. Phagocytosis of nucleated and mature beta thalassaemic red blood cells by mouse macrophages in vitro. *Br. J. Haematol.* 1979;43(2):251-255.

102. Kolbus A, Pilat S, Husak Z, et al. Raf-1 antagonizes erythroid differentiation by restraining caspase activation. *J. Exp. Med.* 2002;196(10):1347-1353.

103. Kong Y, Zhou S, Kihm AJ, et al. Loss of α -hemoglobin-stabilizing protein impairs erythropoiesis and exacerbates β -thalassemia. *J Clin Invest*. 2004;114(10):1457-1466.

104. Kose S, Furuta M, Imamoto N. Hikeshi, a nuclear import carrier for Hsp70s, protects cells from heat shock-induced nuclear damage. *Cell*. 2012;149(3):578-589.

105. Koulnis M, Liu Y, Hallstrom K, Socolovsky M. Negative autoregulation by Fas stabilizes adult erythropoiesis and accelerates its stress response. *PLoS ONE*. 2011;6(7):e21192.

106. Krystal G, Lam V, Dragowska W, et al. Transforming growth factor beta 1 is an inducer of erythroid differentiation. *J Exp Med*. 1994;180(3):851-860.

107. Kuypers FA, De Jong K. The role of phosphatidylserine in recognition and removal of erythrocytes. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 2004;50(2):147-158.

108. Labie D, Elion J. Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. *EMC - Hématologie*. 2005;2(4):220-239.

109. Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, et al. Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J. Clin. Invest.* 1988;81(2):620-623.

110. Lanneau D, Brunet M, Frisan E, et al. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J. Cell. Mol. Med.* 2008;12(3):743-761.

111. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23(21):2947-2948.

112. Lechauve C, Rezaei H, Celier C, et al. Neuroglobin and prion cellular localization: investigation of a potential interaction. *J. Mol. Biol.* 2009;388(5):968-977.

113. Leecharoenkiat A, Wannatung T, Lithanatudom P, et al. Increased oxidative metabolism is associated with erythroid precursor expansion in β 0-thalassaemia/Hb E disease. *Blood Cells Mol. Dis.* 2011;47(3):143-157.

114. Leppä S, Pirkkala L, Saarento H, Sarge KD, Sistonen L. Overexpression of HSF2-beta inhibits hemin-induced heat shock gene expression and erythroid differentiation in K562 cells. *J. Biol. Chem.* 1997;272(24):15293-15298.

115. Li XF, Anderson J, Hutzler D, Roodman GD. Hemin-induced erythroid differentiation changes the sensitivity of K562 cells to tumor necrosis factor-alpha. *Exp. Hematol.* 1989;17(11):1059-1062.

116. Li H, Rybicki AC, Suzuka SM, et al. Transferrin therapy ameliorates disease in beta-thalassemic mice. *Nat. Med.* 2010;16(2):177-182.

117. Libani IV, Guy EC, Melchiori L, et al. Decreased differentiation of erythroid cells exacerbates ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia. *Blood*. 2008;112(3):875-885.

118. Lindern M von, Zauner W, Mellitzer G, et al. The Glucocorticoid Receptor Cooperates With the Erythropoietin Receptor and c-Kit to Enhance and Sustain Proliferation of Erythroid Progenitors In Vitro. *Blood*. 1999;94(2):550-559.

119. Liu Y, Pop R, Sadegh C, et al. Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. *Blood*. 2006;108(1):123-133.

120. Liu Q, Hendrickson WA. Insights into Hsp70 chaperone activity from a crystal structure of the yeast Hsp110 Sse1. *Cell*. 2007;131(1):106-120.

121. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487-501.

122. Lombardi G, Matera R, Minervini MM, et al. Serum levels of cytokines and soluble antigens in polytransfused patients with beta-thalassemia major: relationship to immune status. *Haematologica*. 1994;79(5):406-412.

123. Lui JC-K, Kong S-K. Erythropoietin activates caspase-3 and downregulates CAD during erythroid differentiation in TF-1 cells - a protection mechanism against DNA fragmentation. *FEBS Lett.* 2006;580(8):1965-1970.

124. Lui JC-K, Kong S-K. Heat shock protein 70 inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor to avoid DNA fragmentation in TF-1 cells during erythropoiesis. *FEBS Lett.* 2007;581(1):109-117.

125. Mai A, Jelicic K, Rotili D, et al. Identification of two new synthetic histone deacetylase inhibitors that modulate globin gene expression in erythroid cells from healthy donors and patients with thalassemia. *Mol. Pharmacol.* 2007;72(5):1111-1123.

126. Maier-Redelsperger M, Girot R. Les aspects cellulaires de la distribution et de la production de l'hémoglobine fœtale. *Hématologie*. 1996;2(5):437-42.

127. Manor D, Fibach E, Goldfarb A, Rachmilewitz EA. Erythropoietin activity in the serum of beta thalassemic patients. *Scand J Haematol.* 1986;37(3):221-228.

128. Marianna P, Kollia P, Akel S, et al. Valproic acid, trichostatin and their combination with hemin preferentially enhance gamma-globin gene expression in human erythroid liquid cultures. *Haematologica*. 2001;86(7):700-705.

129. Marinova Z, Ren M, Wendland JR, et al. Valproic acid induces functional heat-shock protein 70 via Class I histone deacetylase inhibition in cortical neurons: a potential role of Sp1 acetylation. *J. Neurochem.* 2009;111(4):976-987.

130. Martin DI, Tsai SF, Orkin SH. Increased gamma-globin expression in a nondeletion HPFH mediated by an erythroid-specific DNA-binding factor. *Nature*. 1989;338(6214):435-438.

131. Mashiach E, Schneidman-Duhovny D, Peri A, et al. An integrated suite of fast docking algorithms. *Proteins*. 2010;78(15):3197-3204.

132. Mathias LA, Fisher TC, Zeng L, et al. Ineffective erythropoiesis in β -thalassemia major is due to apoptosis at the polychromatophilic normoblast stage. *Experimental Hematology*. 2000;28(12):1343-1353.

133. Mazzone A, Vezzoli M, Ottini E. Masked deficit of B(12) and folic acid in thalassemia. *Am. J. Hematol.* 2001;67(4):274.

134. McDevitt MA, Shivdasani RA, Fujiwara Y, Yang H, Orkin SH. A « knockdown » mutation created by cis-element gene targeting reveals the dependence of erythroid cell maturation on the level of transcription factor GATA-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997;94(13):6781-6785.

135. Means RT Jr, Krantz SB. Inhibition of human erythroid colony-forming units by tumor necrosis factor requires beta interferon. *J. Clin. Invest.* 1993;91(2):416-419.

136. Meliconi R, Uguccioni M, Lalli E, et al. Increased serum concentrations of tumour necrosis factor in beta thalassaemia: effect of bone marrow transplantation. *J. Clin. Pathol.* 1992;45(1):61-65.

137. Merghoub T, Maier-Redelsperger M, Labie D, et al. Variation of fetal hemoglobin and F-cell number with the LCR-HS2 polymorphism in nonanemic individuals. *Blood*. 1996;87(6):2607.

138. Miller CB, Jones RJ, Piantadosi S, Abeloff MD, Spivak JL. Decreased erythropoietin response in patients with the anemia of cancer. *N. Engl. J. Med.* 1990;322(24):1689-1692.

139. Mjahed H, Girodon F, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins in hematopoietic malignancies. *Experimental Cell Research*. 2012;318(15):1946-1958.

140. Mollan TL, Khandros E, Weiss MJ, Olson JS. Kinetics of α -globin binding to α -hemoglobin stabilizing protein (AHSP) indicate preferential stabilization of hemichrome folding intermediate. *J. Biol. Chem.* 2012;287(14):11338-11350.

141. Morimoto R, Fodor E. Cell-specific expression of heat shock proteins in chicken reticulocytes and lymphocytes. *J. Cell Biol.* 1984;99(4 Pt 1):1316-1323.

142. Morimoto RI. Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev.* 2008;22(11):1427-1438.

143. Morioka K, Toné S, Mukaida M, Takano-Ohmuro H. The apoptotic and nonapoptotic nature of the terminal differentiation of erythroid cells. *Exp. Cell Res.* 1998;240(2):206-217.

144. Moshtaghi-Kashanian G-R, Gholamhoseinian A, Hoseinimoghadam A, Rajabalian S. Splenectomy changes the pattern of cytokine production in β -thalassemic patients. *Cytokine*. 2006;35(5–6):253-257.

145. Muchowski PJ, Wacker JL. Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat. Rev. Neurosci.* 2005;6(1):11-22.

146. Nagata M, Arimitsu N, Ito T, Sekimizu K. Antioxidant N-acetyl-L-cysteine inhibits erythropoietininduced differentiation of erythroid progenitors derived from mouse fetal liver. *Cell Biol. Int.* 2007;31(3):252-256.

147. Nathan DG, Gunn RB. Thalassemia: the consequences of unbalanced hemoglobin synthesis. *Am. J. Med.* 1966;41(5):815-830.

148. Olivieri NF. The beta-thalassemias. *N. Engl. J. Med.* 1999;341(2):99-109.

149. Oresco dos Santos C, Duarte ASS, Saad STO, Costa FF. Expression of α-hemoglobin stabilizing protein gene during human erythropoiesis. *Experimental Hematology*. 2004;32(2):157-162.

150. Orkin SH. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood*. 1992;80(3):575-581.

151. Osipiuk J, Walsh MA, Freeman BC, Morimoto RI, Joachimiak A. Structure of a new crystal form of human Hsp70 ATPase domain. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 1999;55(Pt 5):1105-1107.

152. Oyama R, Yamamoto H, Titani K. Glutamine synthetase, hemoglobin alpha-chain, and macrophage migration inhibitory factor binding to amyloid beta-protein: their identification in rat brain by a novel affinity chromatography and in Alzheimer's disease brain by immunoprecipitation. *Biochim. Biophys. Acta*. 2000;1479(1-2):91-102.

153. Pantaleo A, Giribaldi G, Mannu F, Arese P, Turrini F. Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions. *Autoimmun Rev.* 2008;7(6):457-462.

154. Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis JI, et al. Hepcidin in iron overload disorders. *Blood*. 2005;105(10):4103-4105.

155. Papetti M, Wontakal SN, Stopka T, Skoultchi AI. GATA-1 directly regulates p21 gene expression during erythroid differentiation. *Cell Cycle*. 2010;9(10):1972-1980.

156. Park HS, Lee JS, Huh SH, Seo JS, Choi EJ. Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *EMBO J.* 2001;20(3):446-456.

157. Perry RT, Gearhart DA, Wiener HW, et al. Hemoglobin binding to A beta and HBG2 SNP association suggest a role in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 2008;29(2):185-193.

158. Perutz MF, Rossmann MG, Cullis AF, et al. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-A. resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*. 1960;185(4711):416-422.

159. Peschle C, Gabbianelli M, Testa U, et al. c-kit ligand reactivates fetal hemoglobin synthesis in serum-free culture of stringently purified normal adult burst-forming unit-erythroid. *Blood*. 1993;81(2):328-336.

160. Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr. Opin. Immunol.* 1998;10(5):545-551.

161. Pevny L, Lin CS, D'Agati V, et al. Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development*. 1995;121(1):163-172.

162. Pippard MJ, Callender ST, Warner GT, Weatherall DJ. Iron absorption and loading in beta-thalassaemia intermedia. *Lancet*. 1979;2(8147):819-821.

163. Pootrakul P, Josephson B, Huebers HA, Finch CA. Quantitation of ferritin iron in plasma, an explanation for non-transferrin iron. *Blood*. 1988;71(4):1120-1123.

164. Pootrakul P, Sirankapracha P, Hemsorach S, et al. A correlation of erythrokinetics, ineffective erythropoiesis, and erythroid precursor apoptosis in thai patients with thalassemia. *Blood*. 2000;96(7):2606-2612.

165. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999;6(2):99-104.

166. Pratelli L, Verri E, Fortini M, et al. Chelation therapy and bone metabolism markers in thalassemia major. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2006;19(11):1335-1342.

167. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. *R: A language and environment for statistical computing*. 2011. Available at: http://www.R-project.org/.

168. Rateesh KR, Nagarajan NS, Arunraj SP, et al. HSPIR: a manually annotated heat shock protein information resource. *Bioinformatics*. 2012;28(21):2853-2855.

169. Ramos P, Casu C, Gardenghi S, et al. Macrophages support pathological erythropoiesis in polycythemia vera and β -thalassemia. *Nat. Med.* 2013;19(4):437-445.

170. Rao R, Fiskus W, Ganguly S, Kambhampati S, Bhalla KN. HDAC inhibitors and chaperone function. *Adv. Cancer Res.* 2012;116:239-262.

171. Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosisinducing factor. *Nat. Cell Biol.* 2001;3(9):839-843.

172. Ribeil J-A, Zermati Y, Vandekerckhove J, et al. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*. 2007;445(7123):102-105.

173. Ribeil J-A, Arlet J-B, Dussiot M, et al. Ineffective Erythropoiesis in β -Thalassemia. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:394295.

174. Ricci G, Castaldi G, Zavagli G, et al. Red cell 2,3-diphosphoglycerate contents and oxygen affinity in heterozygous beta-thalassaemia. *Acta Haematol.* 1982;68(1):63-64.

175. Rifkind JM, Abugo O, Levy A, Heim J. Detection, formation, and relebance of hemochromes and hemochromes. In: Johannes Everse KDV, éd. *Methods in Enzymology*.Vol Volume 231. Academic Press; 1994:449-480.

176. Ritossa FM. Behaviour of RNA and DNA synthesis at the puff level in salivary gland chromosomes of drosophila. *Exp. Cell Res.* 1964;36:515-523.

177. Rubiolo C, Piazzolla D, Meissl K, et al. A balance between Raf-1 and Fas expression sets the pace of erythroid differentiation. *Blood*. 2006;108(1):152-159.

178. Ruud JT. Vertebrates without erythrocytes and blood pigment. Nature. 1954;173(4410):848-850.

179. Rylski M, Welch JJ, Chen Y-Y, et al. GATA-1-Mediated Proliferation Arrest during Erythroid Maturation. *Mol Cell Biol*. 2003;23(14):5031-5042.

180. Sahara S, Aoto M, Eguchi Y, et al. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature*. 1999;401(6749):168-173.

181. Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat. Cell Biol.* 2000;2(8):476-483.

182. Sankaran VG, Menne TF, Xu J, et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science*. 2008;322(5909):1839-1842.

183. Sankaran VG, Xu J, Ragoczy T, et al. Developmental and species-divergent globin switching are driven by BCL11A. *Nature*. 2009;460(7259):1093-1097.

184. Sankaran VG, Orkin SH. The Switch from Fetal to Adult Hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(1).

185. Schallmeiner E, Oksanen E, Ericsson O, et al. Sensitive protein detection via triple-binder proximity ligation assays. *Nat. Methods*. 2007;4(2):135-137.

186. Schechter AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*. 2008;112(10):3927-3938.

187. Schrier SL, Rachmilewitz E, Mohandas N. Cellular and membrane properties of alpha and beta thalassemic erythrocytes are different: implication for differences in clinical manifestations. *Blood*. 1989;74(6):2194-2202.

188. Schrier SL. Pathobiology of thalassemic erythrocytes. Curr. Opin. Hematol. 1997;4(2):75-78.

189. Schrier SL. Pathophysiology of thalassemia. Curr. Opin. Hematol. 2002;9(2):123-126.

190. Schrier SL, Centis F, Verneris M, Ma L, Angelucci E. The role of oxidant injury in the pathophysiology of human thalassemias. *Redox Rep.* 2003;8(5):241-245.

191. Shalev O, Repka T, Goldfarb A, et al. Deferiprone (L1) chelates pathologic iron deposits from membranes of intact thalassemic and sickle red blood cells both in vitro and in vivo. *Blood*. 1995;86(5):2008-2013.

192. Sharma SK, Christen P, Goloubinoff P. Disaggregating chaperones: an unfolding story. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2009;10(5):432-446.

193. Shibayama N, Sugiyama K, Park S-Y. Structures and oxygen affinities of crystalline human hemoglobin C (β 6 Glu->Lys) in the R and R2 quaternary structures. *J. Biol. Chem.* 2011;286(38):33661-33668.

194. Shinar E, Rachmilewitz EA. Oxidative denaturation of red blood cells in thalassemia. *Semin. Hematol.* 1990;27(1):70-82.

195. Singh MK, Yu J. Accumulation of a heat shock-like protein during differentiation of human erythroid cell line K562. *Nature*. 1984;309(5969):631-633.

196. Smolkin V, Halevy R, Levin C, et al. Renal function in children with beta-thalassemia major and thalassemia intermedia. *Pediatr. Nephrol.* 2008;23(10):1847-1851.

197. Sondhaus CA, Thorell B. Microspectrophotometric Determination of Nonheme Iron in Maturing Erythroblasts and its Relationship to the Endocellular Hemoglobin Formation. *Blood*. 1960;16(3):1285-1297.

198. Sousa R, Lafer EM. Keep the traffic moving: mechanism of the Hsp70 motor. *Traffic*. 2006;7(12):1596-1603.

199. Sritippayawan S, Lekhanont P, Harnruthakorn C, et al. Restrictive lung disease and serum TGFbeta1 in thalassemia major children. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 2005;23(2-3):121-126.

200. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CPZ, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J. Biol. Chem.* 2005;280(46):38729-38739.

201. Szilvassy SJ, Ragland PL, Miller CL, Eaves CJ. The marrow homing efficiency of murine hematopoietic stem cells remains constant during ontogeny. *Exp. Hematol.* 2003;31(4):331-338.

202. Tahara T, Sun J, Igarashi K, Taketani S. Heme-dependent up-regulation of the alpha-globin gene expression by transcriptional repressor Bach1 in erythroid cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;324(1):77-85.

203. Tahara T, Sun J, Nakanishi K, et al. Heme positively regulates the expression of beta-globin at the locus control region via the transcriptional factor Bach1 in erythroid cells. *J. Biol. Chem.* 2004;279(7):5480-5487.

204. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat. Med.* 2007;13(9):1096-1101.

205. Tanno T, Porayette P, Sripichai O, et al. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood*. 2009;114(1):181-186.

206. Tanno T, Noel P, Miller JL. Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease. *Curr. Opin. Hematol.* 2010;17(3):184-190.

207. Testa U, Fossati C, Samoggia P, et al. Expression of growth factor receptors in unilineage differentiation culture of purified hematopoietic progenitors. *Blood*. 1996;88(9):3391-3406.

208. Theodorakis NG, Zand DJ, Kotzbauer PT, Williams GT, Morimoto RI. Hemin-induced transcriptional activation of the HSP70 gene during erythroid maturation in K562 cells is due to a heat shock factor-mediated stress response. *Mol Cell Biol*. 1989;9(8):3166-3173.

209. Thorell B. The relation of the synthesis of hemoglobin to the cellular growth during normal and certain pathological conditions. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1948;25(1-2):54-65.

210. Tiosano D, Hochberg Z. Endocrine complications of thalassemia. *J. Endocrinol. Invest.* 2001;24(9):716-723.

211. Trochet D, Hong SJ, Lim JK, et al. Molecular consequences of PHOX2B missense, frameshift and alanine expansion mutations leading to autonomic dysfunction. *Hum. Mol. Genet.* 2005;14(23):3697-3708.

212. Uma S, Hartson SD, Chen JJ, Matts RL. Hsp90 is obligatory for the heme-regulated eIF-2alpha kinase to acquire and maintain an activable conformation. *J. Biol. Chem.* 1997;272(17):11648-11656.

213. Uma S, Thulasiraman V, Matts RL. Dual role for Hsc70 in the biogenesis and regulation of the heme-regulated kinase of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol. Cell. Biol.* 1999;19(9):5861-5871.

214. Uoshima N, Ozawa M, Kimura S, et al. Changes in c-Kit expression and effects of SCF during differentiation of human erythroid progenitor cells. *Br. J. Haematol.* 1995;91(1):30-36.

215. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, et al. GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem*. 2005;26(16):1701-1718.

216. Varricchio L, Fabucci ME, Alfani E, Godbold J, Migliaccio AR. Compensated variability in the expression of globin-related genes in erythroblasts generated ex vivo from different donors. *Transfusion*. 2010;50(3):672-684.

217. Viprakasit V, Tanphaichitr VS, Chinchang W, et al. Evaluation of alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) as a genetic modifier in patients with beta thalassemia. *Blood*. 2004;103(9):3296-3299.

218. Wajcman H. Hémoglobines : structure et fonction. *EMC - Hématologie*. 2005;2(3):145-157.

219. Wall L, deBoer E, Grosveld F. The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. *Genes Dev.* 1988;2(9):1089-1100.

220. Wanachiwanawin W, Wiener E, Siripanyaphinyo U, et al. Serum levels of tumor necrosis factoralpha, interleukin-1, and interferon-gamma in beta(o)-thalassemia/HbE and their clinical significance. *J. Interferon Cytokine Res.* 1999;19(2):105-111.

221. Watt P, Lamb P, Squire L, Proudfoot N. A factor binding GATAAG confers tissue specificity on the promoter of the human zeta-globin gene. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(6):1339-1350.

222. Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat. Rev. Genet.* 2001;2(4):245-255.

223. Webster SH. Heinz Body Phenomenon in Erythrocytes a Review. *Blood*. 1949;4(5):479-497.

224. Weisberg SJ, Lyakhovetsky R, Werdiger A, et al. Compartmentalization of superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) aggregates determines their toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(39):15811-15816.

225. Weiss MJ, Keller G, Orkin SH. Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev.* 1994;8(10):1184-1197.

226. Weiss MJ, Orkin SH. Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995;92(21):9623-9627.

227. Weiss MJ, Yu C, Orkin SH. Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line. *Mol Cell Biol*. 1997;17(3):1642-1651.

228. Weiss MJ, Santos CO dos. Chaperoning erythropoiesis. Blood. 2009;113(10):2136-2144.

229. Whyatt D, Karis A, Harkes IC, et al. The level of the tissue-specific factor GATA-1 affects the cell-cycle machinery. *Genes Funct.* 1997;1(1):11-24.

230. Whyatt D, Lindeboom F, Karis A, et al. An intrinsic but cell-nonautonomous defect in GATA-1-overexpressing mouse erythroid cells. *Nature*. 2000;406(6795):519-524.

231. Wickramasinghe SN, Bush V. Observations on the ultrastructure of erythropoietic cells and reticulum cells in the bone marrow of patients with homozygous beta-thalassaemia. *Br. J. Haematol.* 1975;30(4):395-399.

232. Wickramasinghe SN, Hughes M. Precipitation of alpha-chains on the centrioles of erythroblasts in beta-thalassaemia. *Br. J. Haematol.* 1982;52(4):681-682.

233. Wilber A, Nienhuis AW, Persons DA. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities. *Blood*. 2011;117(15):3945-3953.

234. Winning RS, Browder LW. Changes in heat shock protein synthesis and hsp70 gene transcription during erythropoiesis of Xenopus laevis. *Dev. Biol.* 1988;128(1):111-120.

235. Wisniewska M, Karlberg T, Lehtiö L, et al. Crystal structures of the ATPase domains of four human Hsp70 isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B', and HSPA5/BiP/GRP78. *PLoS ONE*. 2010;5(1):e8625.

236. Wojda U, Leigh KR, Njoroge JM, et al. Fetal hemoglobin modulation during human erythropoiesis: stem cell factor has « late » effects related to the expression pattern of CD117. *Blood*. 2003;101(2):492-497.

237. Woon Kim Y, Kim S, Geun Kim C, Kim A. The distinctive roles of erythroid specific activator GATA-1 and NF-E2 in transcription of the human fetal γ -globin genes. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(16):6944-6955.

238. Xiao W, Koizumi K, Nishio M, et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits generation of glycophorin A+ cells by CD34+ cells. *Exp. Hematol.* 2002;30(11):1238-1247.

239. Xu J, Sankaran VG, Ni M, et al. Transcriptional silencing of {gamma}-globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. *Genes Dev.* 2010;24(8):783-798.

240. Yao X, Kodeboyina S, Liu L, et al. Role of STAT3 and GATA-1 interactions in gamma-globin gene expression. *Exp. Hematol.* 2009;37(8):889-900.

241. Yoshima T, Yura T, Yanagi H. Heat Shock Factor 1 Mediates Hemin-induced hsp70 Gene Transcription in K562 Erythroleukemia Cells. *J. Biol. Chem.* 1998;273(39):25466-25471.

242. Yu X, Kong Y, Dore LC, et al. An erythroid chaperone that facilitates folding of alpha-globin subunits for hemoglobin synthesis. *J. Clin. Invest.* 2007;117(7):1856-1865.

243. Yuan J, Kannan R, Shinar E, Rachmilewitz EA, Low PS. Isolation, characterization, and immunoprecipitation studies of immune complexes from membranes of beta-thalassemic erythrocytes. *Blood*. 1992;79(11):3007-3013.

244. Yuan J, Angelucci E, Lucarelli G, et al. Accelerated programmed cell death (apoptosis) in erythroid precursors of patients with severe beta-thalassemia (Cooley's anemia). *Blood*. 1993;82(2):374-377.

245. Zago MA, Wood WG, Clegg JB, et al. Genetic control of F cells in human adults. *Blood*. 1979;53(5):977-986.

246. Zamai L, Secchiero P, Pierpaoli S, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis. *Blood*. 2000;95(12):3716-3724.

247. Zermati Y, Fichelson S, Valensi F, et al. Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors. *Exp. Hematol.* 2000;28(8):885-894.

248. Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, et al. Caspase Activation Is Required for Terminal Erythroid Differentiation. *J Exp Med*. 2001;193(2):247-254.

249. Zeuner A, Eramo A, Testa U, et al. Control of erythroid cell production via caspase-mediated cleavage of transcription factor SCL/Tal-1. *Cell Death Differ.* 2003;10(8):905-913.

250. Zhou S, Olson JS, Fabian M, Weiss MJ, Gow AJ. Biochemical Fates of α Hemoglobin Bound to α Hemoglobin-stabilizing Protein AHSP. *J. Biol. Chem.* 2006;281(43):32611-32618.

251. Zhu J, Chin K, Aerbajinai W, et al. Recombinant erythroid Kruppel-like factor fused to GATA1 upregulates delta- and gamma-globin expression in erythroid cells. *Blood*. 2011;117(11):3045-3052.