



HAL
open science

Etude des métabolismes du fer et de l'hème au cours de l'érythropoïèse normale et pathologique (anémie de Blackfan-Diamond)

Sarah Rio

► To cite this version:

Sarah Rio. Etude des métabolismes du fer et de l'hème au cours de l'érythropoïèse normale et pathologique (anémie de Blackfan-Diamond). Biologie cellulaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB055 . tel-01759755

HAL Id: tel-01759755

<https://theses.hal.science/tel-01759755>

Submitted on 5 Apr 2018

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 Descartes

Ecole doctorale BioSPC (Biologie Sorbonne Paris Cité)

Laboratoire « Fer, synthèse d'hème et maladies inflammatoires »

INSERM U1149 Centre de recherche sur l'inflammation

**Etude des métabolismes du fer et de l'hème au cours de
l'érythropoïèse normale et pathologique
(anémie de Blackfan-Diamond)**

Sarah RIO

Thèse de doctorat en biologie moléculaire et cellulaire

Présentée et soutenue publiquement le **11 octobre 2016**

Devant un jury composé de :

Présidente : Dr Sophie VAULONT

Directrice de thèse : Pr Lydie DA COSTA

Rapporteur : Pr Loïc GARCON

Rapporteur : Pr François MOREAU-GAUDRY

Examineur : Dr Patrick MAYEUX

Examineur : Dr Sandrina KINET

Résumé

L'anémie de Blackfan-Diamond (ABD) est une maladie rare qui touche 4 à 7 individus par million de naissances. Cette maladie se manifeste par une érythroblastopénie congénitale sévère ($\leq 5\%$ de précurseurs érythroïdes dans la moelle osseuse). L'anémie est arégénérative et souvent macrocytaire et associée à des malformations osseuses dans 40% des cas. 70% des patients sont porteurs d'une mutation hétérozygote pour un gène de protéine ribosomique dont les plus fréquents sont *RPS19* (25%), *RPL11* (5%) et *RPL5* (7%). La maladie est hétérogène et évolutive. Les liens entre la traduction cellulaire, la morphogenèse et l'érythropoïèse ne sont pas bien élucidés. Les objectifs de cette thèse ont été d'étudier les métabolismes de l'hème et du fer ainsi que l'expression des globines chez des patients atteints d'ABD et dans un modèle shARN ciblant l'expression de ces trois gènes afin de comprendre les causes du tropisme érythroïde de la maladie.

Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence un défaut majeur de synthèse des globines dans cette maladie ayant pour conséquence une augmentation de la quantité d'hème libre dans les cellules induisant une production de formes réactives de l'oxygène qui pourrait être toxique et expliquer en partie l'apoptose cellulaire qui a été mise en évidence au cours de cette maladie auparavant. Le métabolisme du fer ne semble pas altéré dans l'ABD.

L'étude de l'expression de différentes protéines importantes pour l'érythropoïèse au cours de la différenciation érythroïde *in vitro* dans des conditions contrôles et chez des patients a permis de bien caractériser le retard de différenciation déjà connu en cas d'haplo-insuffisances pour les gènes *RPL5* et *RPL11*.

Nous avons montré que le retard de différenciation et le défaut d'hémoglobinisation mis en évidence s'expliquaient par un déficit du facteur de transcription GATA-1 essentiel au cours de l'érythropoïèse. Ce déficit de GATA-1 dans les cellules haplo-insuffisantes en *RPL11* est dû à une dégradation de sa protéine chaperonne HSP70. Nous avons montré que la restauration de HSP70, permet d'augmenter l'expression de GATA-1 et d'améliorer la différenciation érythroïde et l'hémoglobinisation cellulaire en cas d'haplo-insuffisance du gène *RPL11*. Nos résultats permettent de comprendre un peu plus le tropisme érythroïde de l'ABD et de proposer HSP70 comme une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement de l'ABD.

Mots clés : Erythropoïèse, fer, hème, anémie de Blackfan-Diamond, HSP70, GATA-1

Remerciements

Voici une page qu'il me tient particulièrement à coeur de rédiger car si je devais ne retenir qu'une seule chose de mon expérience de thèse ce serait qu'on ne fait rien qui en vaille un peu la peine seul. Aussi, la réussite de ce projet appartient à tous les gens qui y ont contribué.

Tout d'abord je voudrais remercier les membres de mon jury d'avoir accepté de lire mon travail et de le juger. Je remercie ma directrice de thèse le Pr Lydie Da Costa, de m'avoir donné l'opportunité de faire une thèse sur l'ABD. Ce sujet m'a passionné et j'ai pu aller au bout de mes idées grâce à la liberté que l'on m'a laissé. Je la remercie particulièrement pour le soin et le temps passé à la correction de ma thèse ainsi que pour la qualité des collaborations apportées au projet. Je voudrais aussi remercier les directeurs de notre laboratoire les Pr Laurent Gouya et Hervé Puy pour m'avoir initié à la recherche sur les métabolismes du fer et de l'hème. Laurent je te remercie particulièrement pour tout ce que tu as apporté à ce projet, sans toi je n'aurais pas étudié l'expression des protéines HRI et Bach1.

Je voudrais remercier tous les membres de l'équipe ABD qui ont contribué au projet. Ceux qui sont partis : Marine Edwards, Raphaël Derman, Mathilde Dransart, Narjess Karboul et ceux qui sont toujours là : Julie Galimand à l'hôpital Robert Debré et mon collègue Marc Gastou à l'IGR avec lequel j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler et qui a beaucoup apporté à ma thèse grâce à ses résultats sur le rôle de HSP70 dans l'ABD.

Je remercie chaleureusement tous les autres membres de mon laboratoire : Zoubida Karim, Nicolas Ducrot, Raéd Daher, Thibaud Lefebvre, Caroline Schmitt, Sarah Millot, Gaël Nicolas, Arienne Mirmiran, Hugo Lenglet, Katell Peoc'h et Hana Manceau. Zoubida merci de t'être rendue disponible à chaque fois que j'ai eu une question sur le métabolisme du fer. Gaël, merci de m'avoir aidé à construire le shALAS2 et d'avoir accepté de corriger une partie de ma thèse. Hana, ton aide en culture cellulaire au début de ma thèse m'a été précieuse, je te remercie aussi pour m'avoir aidé à réaliser les ELISA présentés dans ce manuscrit. Thibaud, merci pour tous les dosages faits à Louis Mourier pour l'étude du métabolisme du fer. Nicolas, merci de m'avoir supporté à chaque fois que je courais après un anticorps de western blot. Sarah merci beaucoup pour ton soutien à un moment précis où j'en ai eu besoin. Je tiens aussi à remercier notre ancienne directrice de laboratoire le Dr Carole Beaumont qui a une très grande expertise et qui m'a aidé quand elle était encore là. Enfin je voudrais remercier mes

et Batoul. Les amis, merci d'avoir été là, merci de m'avoir autant fait rire et d'avoir rendu le quotidien plus léger. Ce n'est pas le moins important des rôles bien au contraire. Vous étiez le petit plus qui me donnait envie d'y retourner les fois où c'était trop dur et je vous en remercie infiniment.

Je remercie également tous les collègues des équipes environnantes qui participent à la bonne humeur de la salle de repos : Emilie, Blaise, Emmanuelle et Kevin de l'équipe Marcellin; Emilie, Malick, Cécilia et Marcelle de l'équipe Chassin et toute l'équipe Hugot/Ogier-Denis avec laquelle nous avons fêté Noël!

Je remercie aussi tous nos collaborateurs. Le Dr Thierry Leblanc de l'hôpital Saint Louis grâce auquel nous avons eu des cellules de patients. Le Pr Larghero de l'unité de thérapie cellulaire de Saint Louis pour le sang de cordon. Le Dr Jamel El Benna pour son expertise sur les FRO. Merci de m'avoir donné accès aux réactifs et au matériel pour réaliser mes expériences. Le Dr Slim Azouzi qui a apporté la méthode spectrophotométrique de dosage d'hème libre sans laquelle cette thèse ne serait pas complète. Le Dr Narla Mohandas pour son expertise sur la synchronisation cellulaire et l'érythropoïèse. Le Dr Eric Solary qui m'a accepté dans son laboratoire et m'a permis d'utiliser leur plateforme de tri cellulaire et leur laboratoire L3. Le Dr Catherine Etchebest et son étudiante Kaouther Benouirane qui a construit un très beau modèle d'interaction entre FLVCR1 et l'hémopexine *in silico* grâce à notre coopération. Le Dr Patrick Mayeux pour son étude protéomique des cellules shARN et le Dr Valérie Andrieu qui m'a permis d'aller colorer mes lames de cytopspin dans son laboratoire.

Je remercie aussi tout le personnel qui permet notre travail au quotidien : à l'administration, Margot Sauvadet, Pascale Toprieux, Franck Laurans, Nicaise Commin, Milène Berthelot, et Mathieu Rapoport; au courrier, Jocelyn Rigot. Je remercie aussi Edwige Bourdon et Christelle Loubiat de la laverie.

Enfin, je remercie le laboratoire d'excellence GR-EX qui a financé ma thèse et mes congrès ainsi que l'ANR et l'INSERM pour le soutien financier apporté au projet.

Pour finir, j'aimerais remercier ma famille qui m'a beaucoup soutenue durant ce projet. Je voudrais leur dire à quel point j'ai conscience d'avoir énormément de chance de les avoir et leur exprimer toute ma gratitude.

« Pour figurer le vent, outre le fléchissement des branches et le rebroussement des feuilles à son approche, tu représenteras les nuages de fine poussière mêlés à l'air troublé ».

Léonard de Vinci

SOMMAIRE

SOMMAIRE

Abréviations principales	4
Liste des figures	7
Liste des tableaux	9
CHAPITRE I : INTRODUCTION	10
I/ L'érythropoïèse	10
A/ Présentation générale	10
A.1/ L'hématopoïèse	10
A.2/ Les différents organes hématopoïétiques au cours de l'ontogénèse	14
B/ La différenciation érythroïde : aspects morphologiques et cellulaires	15
B.1/ L'érythropoïèse précoce	15
B.2/ L'érythropoïèse tardive	16
C/ Régulation de l'érythropoïèse chez l'Homme	19
C.1/ Régulation systémique de l'érythropoïèse	19
C.1.1/ La synthèse et la régulation de l'érythropoïétine	19
C.1.2/ La régulation systémique du fer	20
C.2/ Régulations physico-chimiques de l'érythropoïèse	22
C.2.1/ L'îlot érythroblastique régule la différenciation érythroïde dans la moelle	22
C.2.2/ Régulation par l'EPO	24
C.2.3/ Les facteurs chimiques qui favorisent l'érythropoïèse	30
C.2.4/ Les cytokines qui régulent négativement l'érythropoïèse	31
C.2.5/ Rôles des protéines chaperonnes au cours de l'érythropoïèse	32
C.3/ Régulations génétiques	34
C.3.1/ Séquences en <i>cis</i> impliquées dans la régulation des gènes exprimés au cours de l'érythropoïèse	34
C.3.2/ Les facteurs <i>trans</i> -régulateurs de l'érythropoïèse	35
D/ Les métabolismes de l'hème et du fer	39
D.1/ L'hème	39
D.1.1/ Définition	39
D.1.2/ Structure de l'hémoglobine	39
D.1.3/ La biosynthèse de l'hème et son transport dans l'organisme	40
D.1.3.1/ La biosynthèse d'hème	40

D.1.3.2/ Le transport de l'hème dans l'organisme	42
D.1.4/ Le catabolisme de l'hème	48
D.2/ L'entrée du fer dans les érythroblastes	50
D.3/ Régulation de l'érythropoïèse par le fer et l'hème	51
D.3.1/ Régulation de l'érythropoïèse par le fer	52
D.3.2/ Régulation de l'érythropoïèse par l'hème	54
II/ L'anémie de Blackfan-Diamond (ABD) : une érythroblastopénie congénitale	57
A/ Caractéristiques épidémiologiques et cliniques de l'ABD	57
B/ Le traitement de l'ABD	59
C/ L'évolution clinique de l'ABD	61
D/ Caractéristiques génétiques de l'ABD	62
E/ Mécanismes physiopathologiques de l'ABD	63
E.1/ Modèles animaux permettant l'étude de l'ABD	63
E.2/ Etude de l'ABD chez l'Homme	67
III/ L'anémie de Blackfan-Diamond : une maladie du ribosome	69
A/ Phylogénie du ribosome	69
B/ La biogénèse des ribosomes chez les eucaryotes	69
C/ La synthèse protéique chez les eucaryotes	72
D/ Altération de la synthèse protéique dans l'ABD	75
D.1/ Rôles des protéines RPS19, RPL5 et RPL11	75
D.2/ Les altérations de traduction dans l'ABD	78
IV/ Le projet de recherche et les objectifs de la thèse	81
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	83
I/ Culture cellulaire	83
II/ Cytométrie de flux	84
III/ Vecteurs plasmidiques et production des lentivirus	84
IV/ Transcription reverse et PCR quantitative	85
V/ Immuno-buvardage	86
VI/ Quantification de l'hème	87
VII/ Quantification des FRO	88
VIII/ Quantifications de l'hepcidine, de l'érythropoïétine et de l'hémopexine dans les plasmas de patients et bilans martiaux	89
IX/ Analyses statistiques	89

CHAPITRE III : RESULTATS	90
I/ Etude de l'ABD dans le modèle shARN	90
A/ Efficacité du modèle shARN	90
B/ Mise en évidence d'une surcharge en hème libre et d'un défaut de synthèse des chaînes de globines dans l'ABD	91
C/ La synthèse d'hème est diminuée dans l'ABD	95
D/ Etude de la traduction dans l'ABD	96
E/ Mise en évidence d'un déficit de GATA-1 dans l'ABD	97
F/ Synchronisation des cellules du modèle shARN	98
II/ Etude de l'érythropoïèse dans des cellules primaires <i>in vitro</i>	100
A/ Différenciation érythroïde « normale » de CD34⁺ non-infectées issues de sang de cordon <i>in vitro</i>	100
A.1/ Immuno-buvardages	101
A.2/ Analyse de la différenciation érythroïde <i>in vitro</i> par RT-PCRq	103
B/ Etude de l'érythropoïèse de patients atteints d'ABD <i>in vitro</i>	105
B.1/ Métabolisme du fer	105
B.2/ EPO et hémopexine	106
B.3/ Différenciation <i>in vitro</i> : confirmation des phénotypes observés dans le modèle shARN chez les patients atteints d'ABD	108
B.3.1/ Production de FRO	108
B.3.2/ Le retard de différenciation érythroïde est très modéré chez les patients RPS19^{mut/+}	109
B.3.3/ La différenciation érythroïde est retardée chez les patients atteints d'ABD porteurs de mutations dans un gène RP autre que RPS19 : RPS19^{+/+}	113
B.3.4/ Dosages d'hème total	117
III/ Expérience de sauvetage de GATA-1 <i>via</i> HSP70 et de réversion du phénotype des cellules « shRPL11 » <i>in vitro</i>	117
CHAPITRE IV : DISCUSSION ET PERSPECTIVES	125
Références bibliographiques	134
Annexe 1	160
Annexe 2 : Article 1 « A role for HSP70 in Diamond-Blackfan anemia »	161

ABREVIATIONS

A

Aa-ARNt : aminoacyl transfer ribonucleic acid
ABCG2 : breast cancer resistance protein 2
ABD : anémie de Blackfan-Diamond
ADaE : adénosine désaminase érythrocytaire
ADN : acide désoxyribonucléique
AGM : aorte-gonade-mésonephros
AHSP : α hemoglobin-stabilizing protein
AKT : protéine kinase B
ALA : acide Δ -aminolévulinique
ALAD : acide Δ -aminolévulinique déhydratase
ALAS : 5-aminolevulinic acid synthase (1 ou 2)
AP-1 : activator protein 1
ARE : antioxydant response element
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messenger
ARNr : acide ribonucléique ribosomique
ARNt : acide ribonucléique de transfert
ATP : adénosine triphosphate

B

Bach1 : BTB and CNC homology 1
Bad : Bcl-2-associated death promoter protein
bHLH : basic helix-loops-helix
Bim : Bcl-2-like protein 11
Bcl-XL : B-cell lymphoma-extra large
BFU-E : burst forming unit-érythroïd
BFU-MK : burst forming unit-megakaryocyte
Btk : Bruton's tyrosine kinase

C

CBP : creb binding protein
CDX : cluster de différenciation X
CFU-E : colony forming unit-érythroïd
CFU-GEMM : colony forming unit granulocyte-érythroïd-macrophage-megakaryocyte
CFU-GM : colony forming unit granulocyte-macrophage
CFU-MK : colony forming unit megakaryocyte
CIS : cytokine-induced stat inhibitor
c-Kit : récepteur du stem cell factor
CLP : progéniteur lymphoïde commun
CMP : progéniteur myéloïde commun
CPO : coproporphyrinogène III oxydase
CREB : c-amp response element-binding protein
CSH : cellule souche hématopoïétique

D

Dcytb : cytochrome b duodénal
DGCR8 : digeorge critical region-8
DKC : dyskératose congénitale
DMT1 : divalent metal transporter 1
Dsk : dark skin

E

EB : érythroblaste
ECL3 : boucle extracellulaire 3
EIF2 : eukaryotic translation initiation factor 2
EKLF : erythroid kruppel-like factor
EMP : protéine érythroblaste macrophage
eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase
EPO : érythropoïétine
EPOR : récepteur à l'érythropoïétine
ErFe : érythroferrone
ERK : extracellular regulated kinase
EryP : précurseur érythroïde
ETS : external transcribed spacer

F

FABP : fatty acid binding protein
FasL : fas ligand
FcRX : récepteur aux domaines constants des immunoglobulines X
Fe : fer
FECH : ferrochélatase
FIH-1 : factor inhibiting HIF-1
FLVc : virus leucémique félin de type C
FLVCR : récepteur du virus leucémique félin de type C
FPN : ferroportine
FOG-1 : friend of GATA-1
FRO : formes réactives de l'oxygène
FTH ou FTL : chaîne lourde (H) ou légère (L) de la ferritine
FtMt : ferritine mitochondriale

G

GAB1 et 2 : GRB2 associated binding protein 1-2
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase
GC : glucocorticoïde
Gfi-1b : growth factor independent 1b transcription repressor
GFP : green fluorescent protein
GM-CSF : granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GMP : progéniteur granulo-macrophagique
GPA : glycophorine A
GR : récepteur des glucocorticoïdes
Grb2 : growth factor receptor-bound protein 2
GRE : glucocorticoid regulatory element
GSK3 : glycogen synthetase kinase 3
GST : glutathione S-transférase
GTP : guanosine triphosphate

H

Hb : hémoglobine

HBP : heme binding protein
HCPI : heme carrier protein 1
HIF : hypoxia inductible factor
HMBS : hydroxyméthylbilane synthase
HMOX : hème oxygénase
HPX : hémopexine
Hre : hypoxia response element
HRE : heme responsive elements
HRI : heme regulated kinase
HRM : heme regulatory motif
HRG : heme responsive gene
Hsc : heat shock cognate
Hsp : heat shock protein

I

IBMFS : syndrômes de défaillance de moelle osseuse hérités
ICAM : intercellular adhesion molecule
ILX : interleukine X
IP3 : inositol 1,4,5-trisphosphate
iPSC : induced pluripotent stem cell
INF- γ : interféron γ
iNOS : inducible nitric oxide synthase
IRE : iron responsive element
IRP : iron regulatory protein
IRS-2 : insulin receptor substrate 2

J

JAK-2 : janus kinase 2
JH : JAK homology
JNK : jun kinase

K

KEAP1 : kelch like ech associated protein 1

L

LCR : locus region control
LMO2 : LIM domain only 2
LMPP : lymphoid primed multipotent progenitor
Lnk : lymphocyte-specific adapter protein
LRP1 : LDL receptor-related protein 1 ou CD91
LT-HSC : long-term repopulating hematopoietic stem cells

M

MAPK : mitogen activator protein kinase
MARE : MAF recognition element
MC : macrophage
MDM2 : murine double minute 2
MFRN1 : mitoferrine 1
MFS : major facilitator superfamily
MEL : mouse erythroleukemia cells
MEP : progéniteur érythro-mégacaryocytaire
Met : méthionine
MGG : May-Grünwald Giemsa
MkP : précurseur mégacaryocytaire

MPP : progéniteur multipotent
MyRP : progéniteur restreint à la lignée myéloïde

N

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate H⁺
NF-E2 : nuclear factor erythroid-2
NF-KB : nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells
NLS : signal de localisation nucléaire
Nrf : NF-E2 related factor
NTBI : fer non lié à la transferrine

P

PBG : porphobilinogène
PCARP : ataxie du cordon postérieur rétinite pigmentaire
PI3K : phosphoinositide 3-kinase
PLC : phospholipase C
PHD : prolyl-hydroxylase
PPIX : protoporphyrine IX
PPOX : protoporphyrinogène oxydase
pRb : retinoblastoma protein

R

RP : protéine ribosomique
RPL : protéine ribosomique de la grande sous-unité
RPS : protéine ribosomique de la petite sous-unité
RT-PCRq : reverse transcription quantitative polymerase chain reaction

S

SAPK : stress-activated protein kinase
SCF : stem cell factor
SCL : stem cell leukemia
shARN : acide ribonucléique court en boucle
snoRNP : ribonucléoprotéine nucléolaire
SOCS : suppressor of cytokine signaling
SOS : son of sevenless
SP1 : specificity protein 1
STAT : signal de transduction activateur de transcription
Steap 3 : antigène épithelial de la prostate 3
ST-HSC : short-term repopulating hematopoietic stem cells
SVF : sérum de veau foetal

T

TAL-1 : T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1
Tfr1 : récepteur à la transferrine 1
TGF- β 1 : transforming growth factor β 1
TIBC : capacité totale de liaison du fer
TNF- α : tumor necrosis factor α
TPO : thrombopoïétine
TRPC2 : transient receptor potential cation channel 2
TS : saturation de la transferrine

U

UROD : uroporphyrinogène III décarboxylase

UROS : uroporphyrinogène III synthase

UTR : région non traduite de l'ARNm

V

VCAM1 : vascular cell adhesion molecule 1

pVHL : protéine Von Hippel Lindau

Z

ZnMP : zinc mésoporphyrine

ZnPP : zinc protoporphyrine

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** L'hématopoïèse : vue générale (p.10)
- Figure 2.** Les différents modèles de l'hématopoïèse (p.12)
- Figure 3.** Les différents organes hématopoïétiques chez l'Homme en fonction de l'âge (p.14)
- Figure 4.** Aspects morphologiques de la différenciation érythroïde (p.17)
- Figure 5.** Marqueurs membranaires exprimés au cours de la différenciation érythroïde (p.18)
- Figure 6.** La régulation systémique de l'érythropoïèse (p.22)
- Figure 7.** Schéma d'un îlot érythroblastique (p.24)
- Figure 8.** Les différentes cascades de régulation induites par l'activation de l'EPOR par l'EPO (p.29)
- Figure 9.** Les différents facteurs exogènes nécessaires à la différenciation érythroïde (p.31)
- Figure 10.** Profils d'expressions des facteurs de transcription GATA-1 et GATA-2 au cours de l'érythropoïèse (p.35)
- Figure 11.** Le complexe transcriptionnel activateur (GATA/LDB1/Lmo-2/TAL-1/E2A) (p.38)
- Figure 12.** Structure de l'hémoglobine et de l'hème (p.39)
- Figure 13.** Les huit étapes de la biosynthèse de l'hème (p.42)
- Figure 14.** Le transport d'hème périphérique et cellulaire (p.44)
- Figure 15.** Les deux isoformes a et b de l'exporteur d'hème FLVCR1 et leurs rôles respectifs (p.47)
- Figure 16.** La réaction de dégradation de l'hème par l'hème oxygénase (p.48)
- Figure 17.** Le catabolisme de l'hème par l'organisme mobilise plusieurs organes (p.50)
- Figure 18.** Acquisition du fer par les érythroblastes (p.52)
- Figure 19.** La régulation par le fer : le système IRE/IRP (p.54)
- Figure 20.** La régulation de Bach1 par l'hème (p.56)
- Figure 21.** La régulation de HRI et de la traduction par l'hème (p.57)
- Figure 22.** Illustrations de modèles animaux pour l'ABD (p.66-67)
- Figure 23.** Schéma de la synthèse du ribosome eucaryote (p.71)
- Figure 24.** Les étapes d'initiation de la synthèse protéique chez les eucaryotes (p.73)

- Figure 25.** La phase d'élongation de la synthèse protéique chez les eucaryotes (p.74)
- Figure 26.** Le complexe 5S RNP (5S ARNr/RPL5/RPL11) active la p53 quand la synthèse de ribosome est altérée (p.77)
- Figure 27.** Anomalies de la maturation des ARNr en fonction des gènes mutés au cours de l'ABD (p.80)
- Figure 28.** Conséquences de l'altération de la biogenèse du ribosome au cours de l'ABD (p.81)
- Figure 29.** Efficacité du modèle shARN dans des CD34⁺ issues de sang de cordon à J9 (p.90)
- Figure 30.** Surcharge en hème libre dans les conditions shRPL5, shRPL11 et shRPS19 à J9 (p.92)
- Figure 31.** Retard d'hémoglobinisation dans les conditions shRPL5, shRPL11 et shRPS19 à J12 (p.93)
- Figure 32.** Surcharge en hème libre et défaut d'hémoglobinisation dans l'ABD à J9 (p.94)
- Figure 33.** La synthèse d'hème et l'import de fer sont réduits dans les conditions shRPL5, shRPL11 et shRPS19 à J9 (p.95-96)
- Figure 34.** La traduction est activée mais réduite dans les conditions shRPL5, shRPL11 et shRPS19 à J9 (p.97)
- Figure 35.** L'expression de GATA-1 est réduite dans les conditions shRPL5, shRPL11 et shRPS19 (p.98)
- Figure 36.** La synchronisation des cellules shRPs aux stades BFU-E et CFU-E à J6 montre un défaut intrinsèque des cellules conduisant à une érythropoïèse inefficace (p.99-100)
- Figure 37.** Profils d'expression des protéines d'intérêt dans des CD34⁺ issues de sang de cordon en différenciation érythroïde *in vitro* (p.102-103)
- Figure 38.** Comparaison transcriptionnelle des CD34⁺ issues de sang cordon et de sang périphérique en différenciation érythroïde *in vitro* par RT-PCRq (p.104)
- Figure 39.** Mort cellulaire et prolifération de CD34⁺ issues de sang de cordon et de sang périphérique en différenciation érythroïde *in vitro* (p.105)
- Figure 40.** Dosages d'EPO et d'hémopexine chez les patients atteints d'ABD (p.108)
- Figure 41.** Production de FRO chez les patients atteints d'ABD à J9 (p.108)
- Figure 42.** Différenciation érythroïde du patient ABD35 (mutation RPS19) *in vitro* (p.110)
- Figure 43.** Différenciation érythroïde du patient ABD826 (mutation RPS19) *in vitro* (p.111)
- Figure 44.** Différenciation érythroïde du patient ABD591 (mutation RPS19) *in vitro* (p.112)

Figure 45. Profils transcriptionnels des globines α et β (HBA et HBB), GATA-1, ALAS2, ferrochélatase, CD71, RPS19, EIF2 α et HRI au cours de la différenciation érythroïde *in vitro* chez le patient ABD35 muté pour le gène *RPS19* (p.112)

Figure 46. Différenciation érythroïde *in vitro* du patient ABD1099 (mutation RPL11) (p.113-114)

Figure 47. Profils transcriptionnels des globines α et β (HBA et HBB), GATA-1, ALAS2, ferrochélatase, CD71, RPL11, RPS19, EIF2 α et HRI au cours de la différenciation érythroïde *in vitro* chez le patient ABD1099 muté pour le gène *RPL11* (p.114)

Figure 48. Différenciation érythroïde *in vitro* du patient ABD631 (mutation inconnue) (p.115)

Figure 49. Accumulation d'hème libre chez les patients RPL5^{mut/+} (p.116)

Figure 50. Expression transcriptionnelle réduite de GATA-1, EIF2 α , CD71, ALAS2, des globines α et β (HBA et HBB) chez un patient RPL5^{mut/+} (p.116)

Figure 51. Dosage hème total chez deux patients atteints d'ABD à J12 (p.117)

Figure 52. HSP70 permet de restaurer l'expression de GATA-1, l'hémoglobination et la différenciation des cellules CD34⁺ transduites avec un shRPL11 ou un shRPS19 à J9 (p.119)

Figure 53. HSP70 permet de restaurer l'expression transcriptionnelle de GATA-1 et des globines α et β (HBA et HBB) dans les cellules shRPS19 et shRPL11 à J9 (p.119)

Figure 54. Dosage d'hème total, production de FRO, et expression de FLVCR1 dans les conditions shRPS19, shRPS19+ ADNc HSP70, shRPL11 et shRPL11+ ADNc HSP70 par rapport au shcontrôle (p.122)

Figure 55. Pourcentage de mortalité cellulaire dans les conditions shRPs et contrôles avec ou sans HSP70 (p.123)

Figure 56. Schéma récapitulatif final (p.133)

Figure supplémentaire 1. Les cellules shRPL5, shRPL11 et shRPS19 ont un retard de différenciation érythroïde (p.158)

Figure supplémentaire 2. Les cellules shRPL5, shRPL11 et shRPS19 ont un retard de prolifération *in vitro* (p.158)

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : récapitulatif des critères pour le diagnostic de l'ABD (p.59)

Tableau 2 : séquences des amorces de PCR quantitative (SYBRGreen) (p.85-86)

Tableau 3 : bilans martiaux des patients atteints par l'ABD et dosage d'hepcidine (p.107)

Tableau 4 : liste des patients de l'étude (p.160)

INTRODUCTION

I/ L'érythropoïèse

A/ Présentation générale

L'érythropoïèse est un processus biologique finement régulé qui permet la production des érythrocytes ou globules rouges dans l'organisme. Ce processus fait partie d'un ensemble plus vaste de production de cellules sanguines à partir de cellules souches dans la moelle osseuse appelé l'hématopoïèse.

A.1/ L'hématopoïèse

Chez l'adulte environ 2×10^{11} cellules sanguines par jour sont générées pour remplacer les cellules mourantes et maintenir le nombre de cellules sanguines. Toutes les cellules du sang dérivent d'une cellule commune : la cellule souche hématopoïétique (CSH). Cette cellule subit plusieurs étapes de prolifération, de maturation et de différenciation dans la moelle osseuse pour produire les cellules sanguines matures qui sont réparties en trois catégories : les érythrocytes (globules rouges), les plaquettes et les leucocytes (globules blancs) (**Figure 1**).

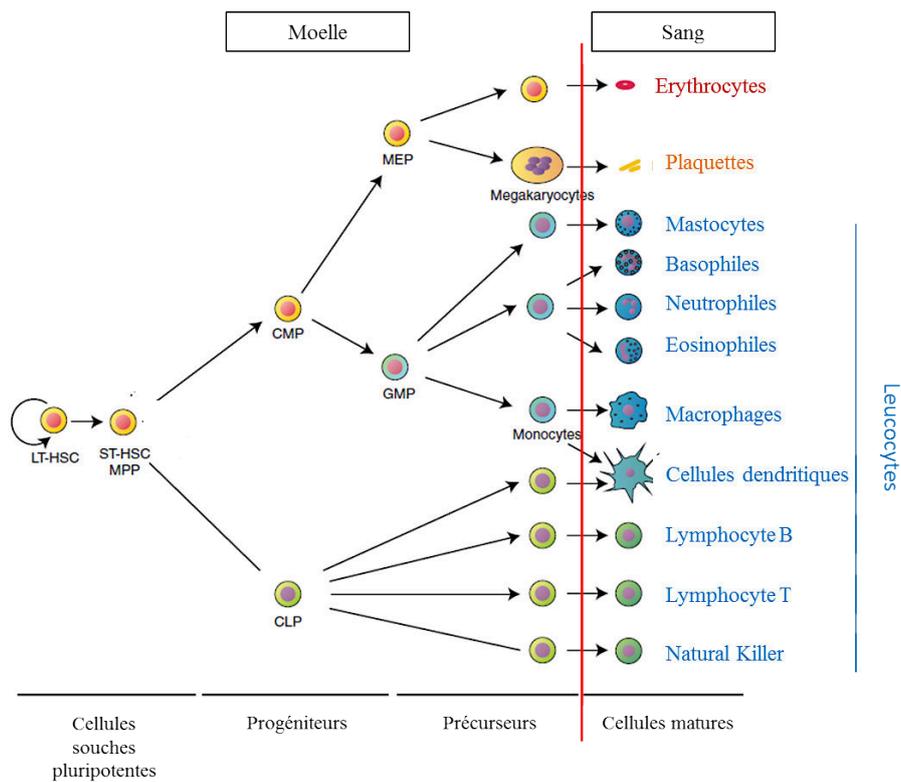


Figure 1. L'hématopoïèse : vue générale (d'après Dzierzak et Philipsen [1])

On peut répartir les cellules hématopoïétiques en quatre grandes classes différentes en se basant sur leurs capacités de renouvellement, de prolifération et de différenciation :

- **Les cellules souches hématopoïétiques**

Les cellules souches hématopoïétiques (CSHs) représentent une petite population cellulaire au sein de la moelle (seulement 0,01 à 0,05 % des cellules médullaires totales). Ce sont des cellules indifférenciées qui possèdent deux propriétés clés : l'auto-renouvellement et la multipotence. Ces propriétés leur permettent de maintenir ou d'augmenter leur nombre dans la moelle osseuse et de se différencier en n'importe quelle cellule du sang. La multipotence des CSHs a été illustrée par l'expérience de Till et McCulloch en 1961 [2] : des cellules médullaires de souris ont été greffées chez des souris syngéniques dont la moelle avait préalablement été irradiée éliminant ainsi toutes les CSHs. La greffe, qui contenait des CSHs, a permis de reconstituer une hématopoïèse normale avec une différenciation des cellules en tous les types cellulaires assurant ainsi la survie des souris. Les CSHs sont classées en deux catégories selon leurs marqueurs membranaires. Les plus primitives sont appelées CSHs de longue durée (LT-HSCs), leur phénotype est $CD133^+CD34^-CD38^-$. Les LT-HSCs ont la capacité de reconstituer de façon pérenne tous les lignages du système hématopoïétique une fois greffées chez une souris syngénique irradiée. Elles se différencient en CSHs de courte durée (ST-HSCs) qui sont $CD34^+CD38^{low}$. Les ST-HSCs n'assurent qu'une production transitoire de moins de trois mois de cellules lymphoïdes et myéloïdes chez un animal adulte irradié. Dans des conditions physiologiques, environ 10% du pool total de CSHs disponibles se divisent et se différencient, les 90% restants sont dans la moelle à l'état quiescent en phase G_0 du cycle cellulaire et constituent une réserve en cas de besoin.

- **Les progéniteurs**

Les progéniteurs hématopoïétiques gardent une grande capacité de prolifération mais ont perdu la capacité d'auto-renouvellement. Ils sont déjà engagés dans une voie de différenciation même s'ils expriment toujours le marqueur CD34. Un modèle canonique existe (**Figure 1**) pour décrire l'organisation et la hiérarchie des cellules hématopoïétiques entre elles. Ce modèle a été défini grâce à des expériences de greffes dans des souris irradiées et à des expériences de différenciation de cellules *in vitro*. Dans le modèle classique (**Figure 2A**), la ST-HSC se différencie en progéniteur multipotent (MPP). Le MPP se divise directement en progéniteur lymphoïde commun (CLP) et progéniteur myéloïde commun (CMP appelé aussi CFU-GEMM ou Colony Forming Unit - Granulocyte – Erythroblaste - Mégacaryocyte – Monocyte) pour donner respectivement les lignées lymphoïde et myéloïde.

Le CMP est à l'origine du progéniteur érythro-mégacaryocytaire (MEP) et du progéniteur granulo-macrophagique (GMP ou CFU-GM). Le MEP, progéniteur bipotent, se différencie ensuite en progéniteurs monopotents érythroïde BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid) et mégacaryocytaire BFU-MK (Burst Forming Unit-Megacaryocyte). Chacun des progéniteurs monopotents BFU-E et BFU-MK se différencie ensuite respectivement en CFU-E (Colony Forming Unit-Erythroid) et en CFU-MK (Colony Forming Unit-Megacaryocyte).

Cette représentation a le mérite de donner une idée assez précise de la succession des évènements au cours de l'érythropoïèse bien qu'elle fasse une description figée de l'hématopoïèse qui est plus plastique et dépendante du micro-environnement médullaire et des différents facteurs de croissance et cytokines qu'il synthétise [3]. De nouvelles versions du modèle classique existent (**Figure 2**), elles sont basées sur des études transcriptomiques en *single cell* (dans une seule cellule) chez la souris qui permettent d'étudier l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cellules hématopoïétiques [4].

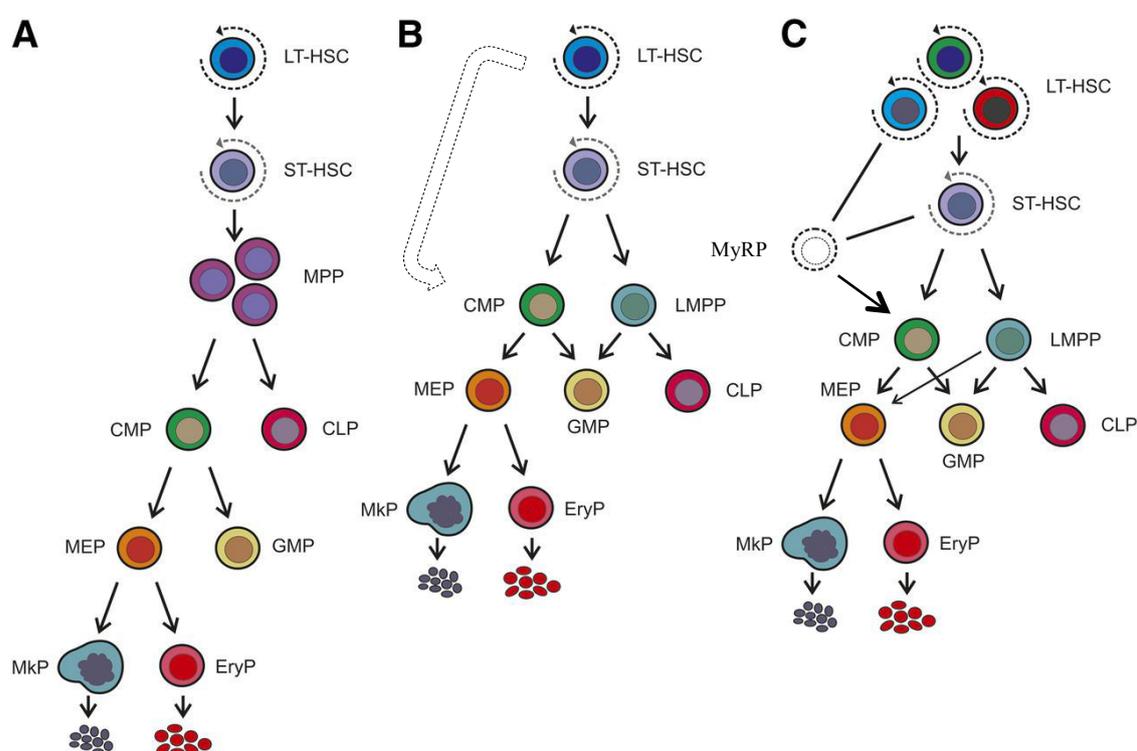


Figure 2. Les différents modèles de l'hématopoïèse (d'après Woolthuis et Park [4]).

A/ Modèle classique. **B/** Modèle révisé. **C/** Modèle myéloïde bypass. Abréviations: LT-HSC (CSH de longue durée), ST-HSC (CSH de courte durée), MPP (progéniteur multipotent), CMP (progéniteur myéloïde commun), CLP (progéniteur lymphoïde commun), MEP (progéniteur érythro-mégacaryocytaire), GMP (progéniteur granulo-macrophagique), LMPP (progéniteur multipotent lymphoïde-engagé), MyRP (progéniteur restreint à la lignée myéloïde), MkP (précurseur mégacaryocytaire), EryP (précurseur érythroïde).

Hu et al. [5] ont montré que 30 à 60% des cellules multipotentes co-expriment des gènes impliqués dans de nombreux lignages. Ce phénomène appelé "multilineage priming" (ou engagement multi-lignages) démontre qu'une des clés de la multipotence pourrait être la faculté de ces cellules à exprimer simultanément plusieurs programmes transcriptionnels à priori antagonistes. La version B du modèle classique (**Figure 2B**) a pu être établie à partir d'expériences qui ont démontré que le pool de MPP est hétérogène et que certaines cellules appelées LMPP (ou progéniteur multipotent lymphoïde-engagé) ne possèdent pas de potentiel érythro-mégacaryocytaire mais ont un potentiel granulo-macrophagique. D'autre part, certaines CSHs n'ont pas de potentiel lymphoïde ce qui suggère encore une autre possibilité (**Figure 2B** trait en hachuré). Il existe également une version C du modèle classique appelé modèle myéloïde bypass (**Figure 2C**). Ce modèle suggère que les progéniteurs mégacaryocytaires et myéloïdes sont générés dans le compartiment des CSHs les plus primitives directement à partir du MyRP (ou progéniteur restreint à la lignée myéloïde). Ce modèle suggère que les MyRPs pourraient s'auto-renouveler mais ne pas être multipotents pour autant, ce qui changerait le dogme établi. Les différentes versions du modèle classique illustrent la complexité pour définir la hiérarchie des événements qui conduisent à la production des différents progéniteurs hématopoïétiques. La chronologie des événements peut changer en fonction des techniques et des critères utilisés mais aussi du modèle (Homme ou souris).

- **Les précurseurs**

Les précurseurs ont perdu les capacités d'auto-renouvellement et de multipotence et ont des capacités de prolifération diminuée par rapport aux progéniteurs. En revanche, ils sont engagés dans la différenciation cellulaire : chaque stade de maturation correspond à une division cellulaire ce qui signifie que les deux cellules filles issues de la mitose sont différentes de la cellule mère. Ce sont les premières cellules morphologiquement identifiables dans chaque lignée. L'observation au microscope optique de frottis après coloration MGG (May-Grünwald Giemsa) permet de distinguer les différents précurseurs en fonction de leur taille, de la structure chromatinienne, du rapport nucléocytoplasmique et de l'aspect du cytoplasme.

- **Les cellules matures**

Les cellules différenciées vont quitter la moelle osseuse et passer dans le sang pour finir leur maturation et accéder à un autre tissu dans lequel elles assurent leur fonction.

A.2/ Les différents organes hématopoïétiques au cours de l'ontogenèse

Les sites anatomiques où se déroule l'hématopoïèse diffèrent selon l'âge. Au stade embryonnaire, différentes études chez la souris [6][7] ont démontré que chez ces mammifères les CSHs étaient issues de la région AGM aorte-gonade-mésonephros d'origine mésodermique. Au cours de la vie intra-utérine, l'hématopoïèse primitive a lieu dans le sac vitellin et dans le placenta, deux sites extra-embryonnaires. Ensuite, l'hématopoïèse est dite définitive. Elle se déroule dans le foie et la rate fœtaux de deux à sept mois et enfin dans la moelle osseuse à partir du quatrième mois. Après la naissance, l'hématopoïèse se déroule principalement dans la moelle osseuse rouge des tissus spongieux des épiphyses des os plats [8][9] où il existe des territoires cellulaires spécialisés qui sous-tendent la prolifération, la quiescence ou la différenciation des cellules hématopoïétiques et qui sont appelés "niches hématopoïétiques". Elles sont constituées de cellules stromales mésenchymales, d'ostéoblastes, de cellules endothéliales, de macrophages et d'une matrice extracellulaire riche en glycoprotéines (collagènes et protéoglycanes) [10][11]. Certains os du squelette produisent plus de CSHs que d'autres. Il s'agit des moelles des os du sternum, de la base du crâne, des os iliaques, des vertèbres, des épiphyses des os longs et des maxillaires. De plus, la cellularité des os varie en fonction de l'âge : de la naissance à vingt ans, les os du tibia et du fémur participent aussi à la production hématopoïétique mais plus après. D'une façon générale, la cellularité des os est maximale à la naissance et diminue entre 15 à 50 ans pour se stabiliser [12] (**Figure 3**).

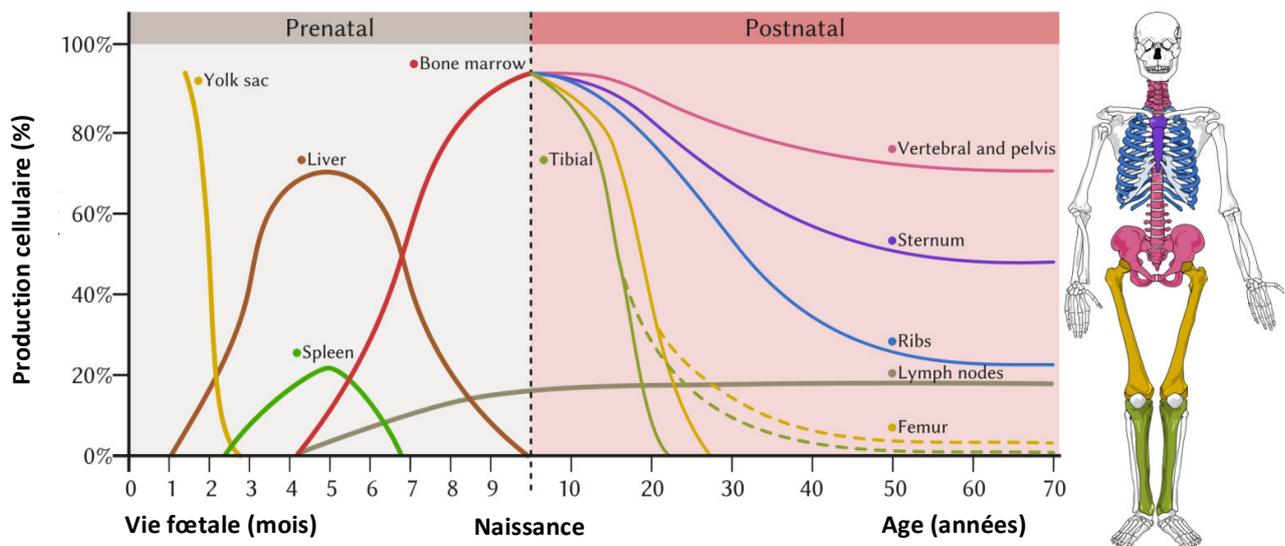


Figure 3. Les différents organes hématopoïétiques chez l'Homme en fonction de l'âge (d'après Michal Komorniczak)

B/ La différenciation érythroïde : aspects morphologiques et cellulaires

La différenciation des cellules souches multipotentes en réticulocytes est un processus finement régulé qui comprend plusieurs stades distincts identifiables phénotypiquement (**Figure 4**). Au fur et à mesure de la différenciation la taille des cellules diminue ainsi que la taille du noyau qui finit par être expulsé de la cellule au stade acidophile. L'érythropoïèse peut être schématiquement divisée en deux étapes : une phase précoce (de la CSH au stade CFU-E) et une phase tardive (du stade proérythroblaste au globule rouge).

B.1/ L'érythropoïèse précoce

Les progéniteurs érythroïdes ne sont pas reconnaissables morphologiquement par coloration MGG. On arrive cependant à les identifier par des tests fonctionnels de culture *in vitro*. Les BFU-E et les CFU-E ont une grande capacité d'expansion cellulaire, alors que les précurseurs ont des capacités d'expansion diminuées mais continuent de se diviser et de se différencier.

- **Les BFU-E**

Les BFU-E forment des colonies à partir de cellules souches mises en culture sur de la méthylcellulose. Seulement 40% des BFU-E sont en cycle et prolifèrent [13]. Les BFU-E immatures s'hémoglobinisent en 16 à 18 jours chez l'Homme formant de très grosses colonies avec plusieurs clusters (> 8 clusters ou agrégats cellulaires) contenant au moins deux cent érythroblastes (**Figure 4**). Les BFU-E matures forment des colonies en 10 à 12 jours de culture. Elles sont plus compactes et composées de 1 à 8 clusters ; chaque colonie contenant plus de cent cellules. Les BFU-E ont besoin de SCF (stem cell factor) et d'EPO (érythropoïétine) pour leur prolifération et leur différenciation [14]. Les BFU-E immatures expriment à leur surface les marqueurs protéiques CD34, CD33, HLA-DR et le récepteur au SCF (c-kit ou CD117) mais n'expriment pas le récepteur à l'EPO (EPOR). Au stade BFU-E matures, les cellules commencent à exprimer l'EPOR et CD36 (**Figure 5**).

- **Les CFU-E**

Les CFU-E donnent des colonies de moins de cent cellules ne contenant qu'un cluster avec une hémoglobinisation en 7 à 8 jours [14] (**Figure 4**). Elles représentent 0,3% des cellules hématopoïétiques médullaires et sont pour la plupart en cycle [13]. Elles n'expriment plus CD34 et HLA-DR à leur surface. Elles sont par contre CD36⁺ CD117⁺ et CD71⁺. Ainsi, la captation du fer par les cellules grâce au récepteur à la transferrine 1 (CD71) commence

vers ce stade (**Figure 5**). Les CFU-E expriment l'EPOR et sont dépendantes à l'EPO pour proliférer. Les souris invalidées pour EPO et EPOR meurent au stade embryonnaire (vers le treizième jour) à cause de l'anémie sévère mais aussi de malformations cardiaques et d'anomalies du développement cérébral [15].

B.2/ L'érythropoïèse tardive

La phase tardive de l'érythropoïèse permet d'obtenir environ seize globules rouges à partir d'un seul proérythroblaste et quatre divisions cellulaires en 7 à 8 jours. Du stade proérythroblaste au stade érythroblaste acidophile les cellules sont des précurseurs érythroïdes et au-delà ce sont des cellules matures.

- **Les précurseurs**

Les érythroblastes sont les précurseurs érythroïdes de la moelle osseuse. Ils sont identifiables morphologiquement au microscope optique comme les cellules matures. A partir de la CFU-E, ils se différencient progressivement en proérythroblastes, érythroblastes basophiles, érythroblastes polychromatophiles et érythroblastes acidophiles. Au cours de cette différenciation, on observe une réduction progressive de la taille cellulaire, de la taille du noyau et du rapport nucléo-cytoplasmique ainsi qu'une condensation progressive de la chromatine et une hémoglobination progressive des cellules (**Figure 4**).

- **Les cellules matures**

Le réticulocyte naît de l'énucléation de l'érythroblaste acidophile. Il mature dans la moelle puis passe dans le sang par diapédèse où il termine sa maturation en expulsant la majorité de ses organites cellulaires pour donner un globule rouge biconcave mature.

Différents marqueurs cellulaires permettent d'identifier les différents stades de différenciation des érythroblastes (**Figure 5A**). Vers le stade proérythroblaste, les cellules commencent à synthétiser de l'hémoglobine (Hb) et expriment la glycophorine A (GPA ou CD235a) à leur membrane. Les cellules importent du fer, grâce au récepteur à la transferrine 1 (Tfr1 ou CD71). Elles expriment le marqueur CD36 jusqu'au stade acidophile.

L'équipe du Dr N. Mohandas a développé une technique de tri des précurseurs érythroïdes basée sur l'expression des marqueurs membranaires Band 3 et intégrine α_4 . Les cellules sont d'abord triées sur la base de la GPA; les cellules GPA⁺ sont triées en fonction de leur expression de Band 3 et de l'intégrine α_4 . L'expression de Band 3 augmente au cours de

la différenciation des précurseurs érythroïdes tandis que celle de l'intégrine α_4 diminue. Cela donne un graphique en nuage de points de cytométrie en flux bien caractérisé qui permet de séparer les précurseurs avec une grande pureté [16] (**Figure 5B**).

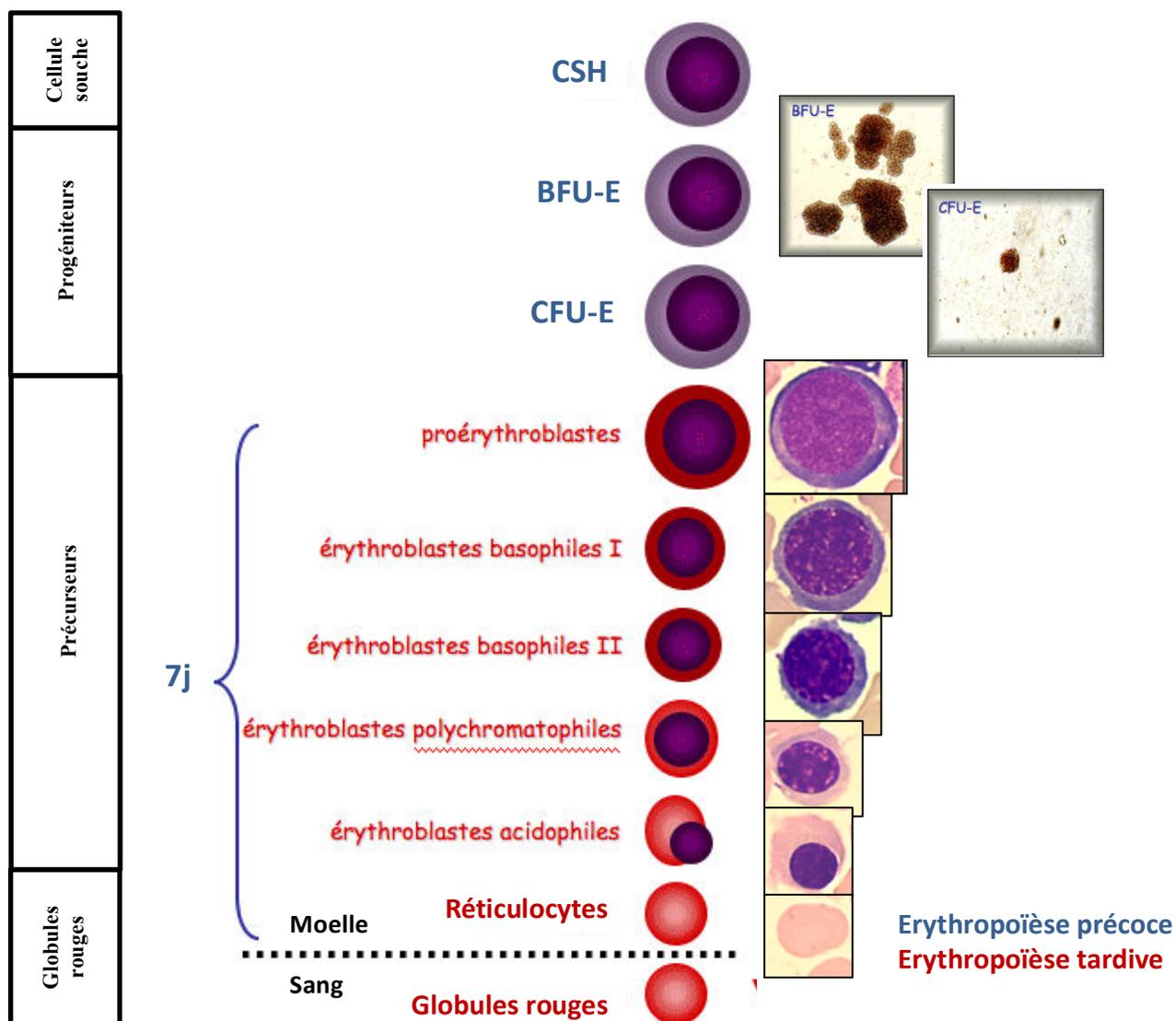
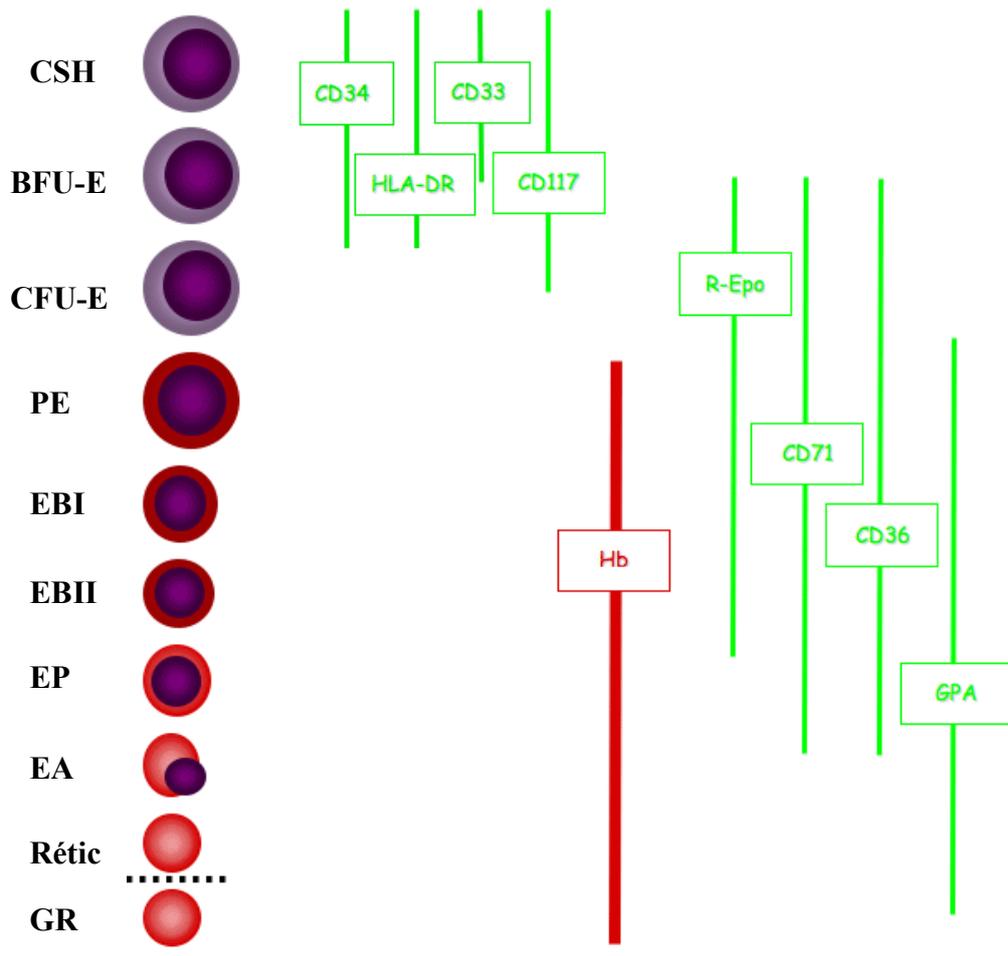
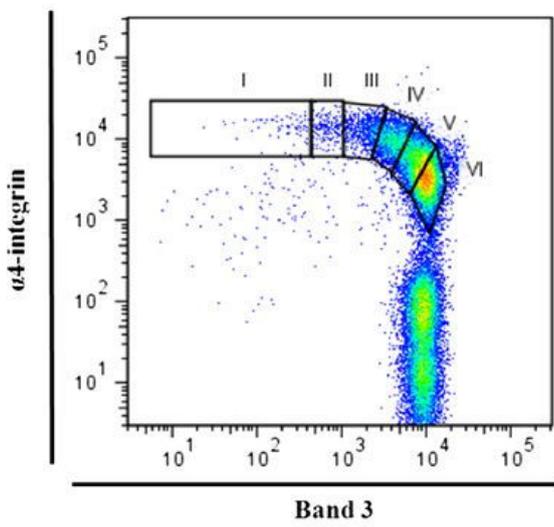


Figure 4. Aspects morphologiques de la différenciation érythroïde. Photographies des colonies de progéniteurs en culture sur méthylcellulose et d'étalements cellulaires (cytopsins) de précurseurs après coloration MGG en microscopie optique (d'après Université de Tours [17])



A



- I : stade proérythroblaste
- II : stade érythroblaste basophile précoce
- III : stade érythroblaste basophile tardif
- IV : stade érythroblaste polychromatophile
- V : stade érythroblaste acidophile

B

Figure 5. Marqueurs membranaires exprimés au cours de la différenciation érythroïde.
A/ Schéma représentant les marqueurs les plus courants (d'après Université de Tours [17]).
B/ Marqueurs proposés par l'équipe du Dr Mohandas (figure Hu et al. [16]). Graphique en nuage de points de cytométrie de flux. **CD34** : sialomucine, **CD33** : lectine, **HLA-DR** : CMH II, **CD117** : récepteur tyrosine kinase du SCF, **EPOR** : récepteur tyrosine kinase de l'EPO, **CD71** : récepteur de la transferrine, **CD36** : récepteur scavenger B1, **GPA** : glycoprotéine du glycocalyx, **Band 3** : transporteur d'anions, **α_4 integrin** : intégrine, **Hb** : hémoglobine

C/ Régulation de l'érythropoïèse chez l'Homme

L'érythropoïèse est un processus dynamique qui est influencé par l'environnement. L'organisme adapte la production de globules rouges en fonction de facteurs environnementaux (haute altitude) et mécaniques (effort sportif). Cela mobilise différents organes. A l'échelle cellulaire, la différenciation érythroïde nécessite un enchaînement de plusieurs cascades de signalisation moléculaires différentes et la migration des cellules dans des tissus spécialisés où elles vont être stimulées par des interactions physiques, des cytokines et des facteurs de croissance.

C.1/ Régulation systémique de l'érythropoïèse (Figure 6)

C.1.1/ La synthèse et la régulation de l'érythropoïétine

L'érythropoïétine (EPO) est une hormone synthétisée à 90% par les fibroblastes interstitiels du cortex et de la membrane externe rénale [18][19]. Cette glycoprotéine de 37 kDa a été découverte par Deflandre et Carnot en 1906 [20]. Elle régule positivement l'érythropoïèse par action sur les progéniteurs et les précurseurs érythroblastiques de la moelle osseuse en cas d'hypoxie. Les taux d'hémoglobine et d'érythropoïétine évoluent inversement en conditions physiologiques. Pour un taux d'hémoglobine moyen de 12 g/dL, le taux d'érythropoïétine circulante est d'environ 20 UI/L. Quand le taux d'hémoglobine descend le taux d'érythropoïétine augmente.

Les cellules rénales sont sensibles aux variations de la pression partielle d'O₂. L'apport d'O₂ au niveau du rein inhibe la transcription du gène codant pour l'EPO tandis qu'en hypoxie (pression partielle en O₂ basse), elle est activée [21]. Les facteurs de transcription de l'EPO sont les facteurs ubiquitaires HIF (Hypoxia Inductible Factor) qui se fixent sur le promoteur du gène de l'EPO (situé sur le chromosome 7) au niveau de la séquence régulatrice Hre (Hypoxia Response Element) [22]. Deux types de protéines constituent les complexes hétérodimériques HIF : les protéines HIF- α (HIF-1 α et HIF-2 α) et HIF- β . En condition normoxique, les protéines HIF- α sont hydroxylées par des prolyl-hydroxylases (PHD) et ubiquitinylées par la protéine Von Hippel Lindau (pVHL), ce qui induit leur dégradation par le protéasome. De plus, en situation de normoxie la protéine FIH-1 (ou Factor Inhibiting HIF-1) bloque la transcription de l'EPO dans le noyau. En condition hypoxique, FIH-1 est inhibée et HIF-1 α -qui n'est plus hydroxylée par PHD2- est transloquée dans le noyau où elle se lie à HIF-1 β exprimé constitutivement et au cofacteur p300/CBP. Le

complexe HIF-1 ainsi formé permet la transcription du gène *EPO* en se fixant à la séquence Hre du promoteur [22].

Les facteurs HIFs régulent également l'expression de nombreux gènes importants pour le métabolisme du fer. Leur stabilisation entraîne une augmentation de l'expression de la ferroportine, protéine exportatrice de fer [23], de la transferrine, une protéine soluble synthétisée par le foie qui est la protéine cargo du fer dans le sang, CD71 qui permet l'entrée du fer dans les érythroblastes [24], de la céruloplasmine, une oxydase du fer [25] et de l'hème oxygénase qui catabolise l'hème [26]. L'activation de HIF-1 permet donc la mobilisation rapide du fer à partir des macrophages et des entérocytes, ainsi que l'augmentation de la synthèse d'EPO pour activer l'érythropoïèse et ainsi permettre l'adaptation et la survie de l'organisme en condition hypoxique.

C.1.2/ La régulation systémique du fer

La régulation de la biodisponibilité du fer pour la synthèse d'hémoglobine est aussi très importante. Environ la moitié du fer présent dans l'organisme (2,5 à 4,5 g au total) est associé aux globines pour former l'hémoglobine [27]. Au bout de 120 jours dans la circulation sanguine, les globules rouges meurent. En conditions physiologiques, 80 à 90% des globules rouges sénescents sont éliminés grâce au processus d'érythrophagocytose ou phagocytose des globules rouges par les macrophages. Les 10 à 20 % restants subissent une hémolyse intra-vasculaire (directement dans le sang) [28]. Ces macrophages sont surtout ceux de la rate. Les macrophages de la moelle et du foie (ou cellules de Kupffer) participent aussi à ce processus mais dans une moindre mesure. Les macrophages dégradent l'hémoglobine des hématies, ce qui permet de recycler 20 à 25 mg de fer par jour soit la quantité requise pour assurer l'érythropoïèse [27][29]. Une partie du fer recyclé est stocké dans les macrophages en étant incorporé dans la ferritine ou en précipitant pour former l'hémosidérine, un pigment ocre insoluble qui constitue une réserve non-utilisable de fer contrairement à la ferritine. La ferritine est une protéine qui permet l'oxydation du fer en Fe (III) et son stockage intracellulaire. Il existe une ferritine cytosolique et une ferritine mitochondriale qui sont codées par des gènes différents. La ferritine cytosolique est un hétéropolymère constitué de 24 sous-unités contenant des chaînes peptidiques lourdes codées par le gène *FTH1* et des chaînes légères codées par le gène *FTL*. La ferritine mitochondriale (FtMt) est codée par un gène sans introns situé sur le chromosome 5. La ferritine mitochondriale est exprimée chez la souris surtout dans les testicules, le cœur, le cerveau, la moelle épinière et le pancréas qui sont des organes à forte activité métabolique mais pas dans la rate et le foie qui sont des

organes de stockage du fer et qui expriment la ferritine cytosolique. Ceci suggère que FtMt prévient les dommages causés par le fer libre dans la mitochondrie en le stockant mais que le fer est préférentiellement stocké dans la ferritine cytosolique [30]. Le fer qui n'est pas stocké est exporté vers le sang grâce à la ferroportine sous forme ferreuse Fe (II) puis oxydé en fer ferrique Fe (III) par la céruloplasmine. Le fer ferrique est pris en charge par la transferrine dans le sang. Ainsi fixé, il est distribué à toutes les cellules en fonction de leur besoin [27].

Nous éliminons entre 1 et 2 mg de fer par jour. Cette perte est compensée par l'absorption d'une quantité équivalente de fer alimentaire par les entérocytes matures du duodénum. Le fer ferrique Fe (III) alimentaire est réduit en fer ferreux Fe (II) par le cytochrome b duodéal (Dcytb), un réducteur de la famille des cytochromes b561. Le fer ferreux pénètre au niveau du pôle apical des entérocytes grâce au transporteur DMT1 (Divalent Metal Transporter 1) [27]. Deux études ont démontré que le fer pénètre aussi dans l'entérocyte sous forme hémique avec une plus grande affinité en utilisant le transporteur HCP1 (Heme Carrier Protein 1) [31][32]. Au pôle basal des entérocytes, le fer est exporté grâce à la ferroportine (FPN), oxydé en Fe (III) par l'héphaestine (protéine de la famille des oxydases multi-cuivre qui partage 50% d'homologie avec la céruloplasmine) et incorporé à la transferrine circulante [33].

L'hepcidine est l'hormone qui régule l'homéostasie du fer [34]. Elle est principalement fabriquée par le foie à partir du gène *Hamp* (chromosome 19). L'hépatocyte dispose de capteurs sensibles à la concentration de fer circulant. En réponse à un excès de fer, l'hépatocyte produit l'hepcidine qui se lie à la ferroportine et provoque son internalisation et sa dégradation (**Figure 6**). L'export de fer dans le sang au niveau des macrophages et au pôle basal des entérocytes est donc inhibé. Au niveau des entérocytes, le fer reste piégé dans la ferritine et est éliminé dans les fèces. A l'inverse, une carence en fer circulant entraîne une diminution de la synthèse de l'hepcidine et une augmentation de l'export de fer. Ce mécanisme régule la sidérémie pour répondre aux besoins de l'érythropoïèse [27]. Le facteur qui sert de senseur de l'érythropoïèse entre la moelle osseuse et le foie pourrait être l'érythroferrone (ErFe), une hormone produite par les érythroblastes qui inhibe la synthèse de l'hepcidine [35]. La synthèse d'EPO et le métabolisme du fer doivent être finement régulés et coordonnés pour permettre une érythropoïèse efficace.

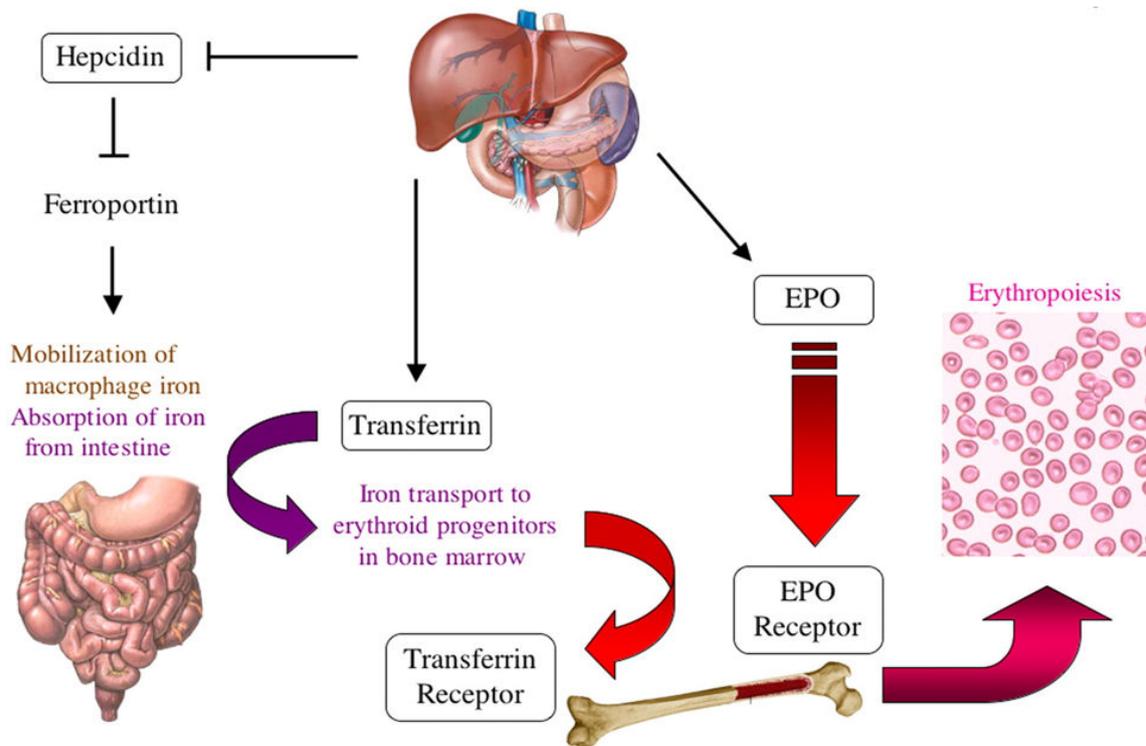


Figure 6. La régulation systémique de l'érythropoïèse (image Semenza [36])

C.2/ Régulations physico-chimiques de l'érythropoïèse

Plusieurs paramètres influent positivement ou négativement sur la différenciation érythroïde. Ces paramètres sont physiques (impliquant des interactions cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire), chimiques (cytokines, facteurs de croissance,...) ou génétiques.

C.2.1/ L'îlot érythroblastique régule la différenciation érythroïde dans la moelle

En 1958, Marcel Bessis découvrait une structure particulière au sein de la moelle osseuse : les îlots érythroblastiques. Ces îlots se composent d'un macrophage central entouré de cinq à trente érythroblastes à différents stades de maturation (**Figure 7**) et sont observables sur des coupes de moelle osseuse en microscopie électronique à transmission et parfois en microscopie optique. Bien que la différenciation érythroïde soit possible *in vitro* sans qu'une co-culture avec ces macrophages soit nécessaire, seule l'interaction avec les macrophages permettrait d'atteindre des taux de prolifération et de différenciation permettant de générer environ deux millions de réticulocytes par seconde en condition d'érythropoïèse normale [3]. Les macrophages centraux purifiés chez l'humain, expriment les marqueurs CD4, CD11a, CD11c, CD18, CD31, HLA-DR and FcRI, FcRII, FcRIII et CD169 [3][37].

La glycoprotéine EMP (protéine érythroblaste macrophage) est exprimée par les érythroblastes (EBs) et les macrophages (MCs) qui peuvent interagir ensemble grâce à des liaisons homophiles. Le blocage de l'EMP par un anticorps anti-EMP induit une diminution de la prolifération, de la maturation et de l'énucléation des érythroblastes associée à une augmentation de l'apoptose d'un facteur six [38]. Les souris invalidées pour cette protéine meurent peu après la naissance et souffrent d'anémie sévère [39]. Bien qu'EMP ait été la première protéine identifiée dans ces interactions EBs/MCs, d'autres couples de protéines ont depuis été trouvés (**Figure 7**). L'intégrine $\alpha_4\beta_1$ exprimée à la surface des EBs interagit avec la protéine VCAM1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) exprimée par les MCs. L'inhibition de cette interaction par des anticorps désorganise la formation des îlots et en réduit le nombre [40]. Un autre couple de protéines a été identifié, il s'agit du couple ICAM-4 (InterCellular Adhesion Molecule 1) (EBs) / α_v (MCs). Le blocage de l'interaction entre ces deux protéines réduit aussi le nombre d'îlots de 70% [41]. Une étude récente a montré dans un modèle de souris invalidée pour l'agrine $\alpha_5\beta_1$ exprimée par les EBs et les MCs une diminution du nombre d'érythroblastes de 30 à 60% chez ces souris ainsi qu'une anémie et une désorganisation des îlots visible en microscopie confocale [42].

Outre leurs fonctions de support, les macrophages centraux auraient également un rôle dans la phagocytose du noyau expulsé par les érythroblastes acidophiles et leur dégradation grâce à la DNase II [43]. Il a été montré que le noyau expulsé exprime à sa surface la phosphatidyl-sérine reconnue par les macrophages comme un signal apoptotique [44]. Les macrophages pourraient aussi servir à l'approvisionnement en fer des érythroblastes. Une étude a montré que les macrophages de la moelle secrètent de la ferritine qui est internalisée et utilisée par les érythroblastes [45].

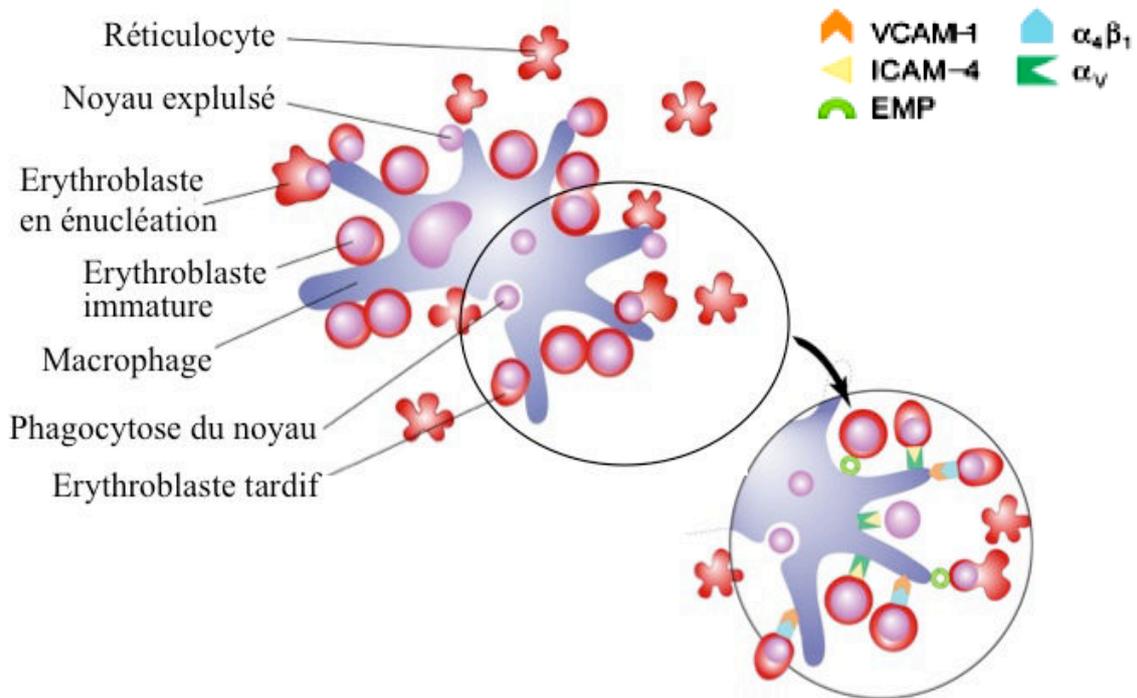


Figure 7. Schéma d'un îlot érythroblastique (d'après Chasis et al. [3])

Des régulations négatives de l'érythropoïèse ont aussi lieu au sein de l'îlot érythroblastique. En effet, les érythroblastes matures peuvent inhiber la survie et la différenciation d'érythroblastes immatures grâce à des interactions FAS/FAS-L. FAS-L est exprimé par les érythroblastes orthochromatiques tandis que FAS est exprimé par tous les érythroblastes et notamment les cellules les plus immatures (proérythroblastes et érythroblastes basophiles) [46][47]. Les progéniteurs plus immatures sont protégés de la voie FAS car ils expriment c-FLIP, un inhibiteur de FAS, tandis qu'entre les stades BFU-E et érythroblaste basophile, la sensibilité au SCF, à l'IL3 et à la thrombopoétine (TPO) rend les cellules sensibles à cette interaction. La cascade d'activation induite par l'interaction FAS/FAS-L induit un arrêt de la maturation érythroïde en activant le clivage de GATA-1 et de TAL-1 (T-cell Acute lymphocytic Leukemia protein 1), deux facteurs de transcription indispensables pour l'érythropoïèse par les caspases 8, 3 et 7 [47]. L'effet de FAS-L sur les érythroblastes immatures est très diminué à de fortes concentrations d'EPO, ce qui permet une activation de l'érythropoïèse [48].

C.2.2/ Régulation par l'EPO (Figure 8)

L'EPO est une cytokine essentielle pour l'érythropoïèse. Quand sa concentration est basse, les progéniteurs et précurseurs érythroïdes meurent par apoptose [49]. Le récepteur à

l'érythropoïétine (EPOR) est exprimé par les érythroblastes à partir des stades BFU-E mature et CFU-E (**Figure 9**) jusqu'au stade d'érythroblaste acidophile (stades de différenciation dits EPO-dépendants). L'EPOR est un récepteur dimérique qui appartient à la famille des récepteurs de cytokines de type I qui sont constitués de trois domaines : extracellulaire, transmembranaire et cytoplasmique. Le domaine extracellulaire comporte deux domaines fonctionnels D1 et D2 permettant la liaison de l'EPO à l'EPOR. Le domaine cytoplasmique comporte plusieurs tyrosines activatrices ainsi que deux séquences conservées appelées boîtes 1 et 2. La boîte 1 est essentielle pour l'adressage de l'EPOR à la membrane plasmique et pour l'interaction de la protéine kinase JAK2 (Janus Kinase 2) avec l'EPOR [50]. Le gène *EPOR* possède une séquence qui est reconnue par GATA-1 sur son promoteur [51]. Lorsque l'EPO se fixe à EPOR, le récepteur change de conformation et JAK-2 située dans la région juxta-membranaire du récepteur est activée. JAK-2 est l'unité catalytique d'EPOR et est nécessaire à son activation. Les souris invalidées pour JAK-2 ont le même phénotype que les souris invalidées pour EPOR [52]. En plus de JAK-2, d'autres kinases sont recrutées (Lyn, Btk) et phosphorylent également les tyrosines cytoplasmiques de l'EPOR permettant le recrutement de divers effecteurs à domaines SH2 comme [50]:

- les protéines à signaux de transduction activateurs de transcription STAT5 et STAT3,
- les phosphatases SHIP-1 et SHP1 et 2
- les protéines adaptatrices Shc, Cbl, CrkL, IRS-2, GAB 1 et GAB 2, CIS, Grb2
- les enzymes modifiant les lipides SHIP, la sous-unité p85 α de la PI3 kinase et PLC γ
- les tyrosines kinases Syk et Tec
- la protéine suppressive de signal SOCS3 (suppressor of cytokine signaling)

L'EPO a une action sur les érythroblastes qui expriment son récepteur dans la moelle osseuse et favorise leur survie et leur prolifération grâce à différentes cascades cellulaires dont toutes les conséquences ne sont pas encore parfaitement connues. Ces cascades de signalisation passent par les voies JAK2-STAT5, PI3K, RAS/MAPK et par l'entrée du calcium dans la cellule [50].

- **La voie JAK2/STAT5 et Bcl-XL (Figure 8)**

JAK2 est une protéine kinase appartient à la famille des JAKs (Janus Kinases). Elle est constituée de sept domaines protéiques JH (JAK Homology) dont 3 sont très conservés dans cette famille de kinases. JH1 porte l'activité catalytique tyrosine kinase et JH2 est un domaine pseudo-kinase. JH1 et JH2 sont situés dans la partie C-terminale du domaine

cytoplasmique de l'EPOR. JH3 à JH7 constituent un domaine FERM qui permet la liaison de JAK2 et de l'EPOR au niveau de l'appareil de Golgi. Ce processus est indispensable pour l'expression d'EPOR à la surface des cellules [53]. Les mutations de la protéine JAK2 sont responsables d'une polyglobulie primitive appelée maladie de Vaquez ou *polycythemia vera*. L'augmentation incontrôlée du nombre de globules rouges induit une augmentation de la viscosité sanguine et peut provoquer des hémorragies, des thromboses et une augmentation du volume de la rate. Les taux de plaquettes et de leucocytes peuvent aussi être augmentés dans cette maladie. On observe une fréquence d'accidents vasculaires plus élevée chez les patients atteints de *polycythemia vera*.

La fixation de l'EPO sur l'EPOR induit une activation de l'EPOR et une transphosphorylation de JAK2 probablement au niveau du résidu tyrosine 1007 [54]. JAK2 activée va phosphoryler des tyrosines de l'EPOR, ce qui va permettre le recrutement de protéines à domaine SH2 impliquées dans la transduction des signaux cytokiniques comme les protéines STATs (Signal de Transduction Activateur de Transcription). Les STATs se fixent à l'EPOR et sont ainsi phosphorylés, ce qui induit leur homodimérisation et leur activation. Les dimères de STATs sont transloqués dans le noyau où ils vont activer la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire. Les protéines STATs peuvent être activées par les trois types de kinases capables de se lier à EPOR : JAK2, Lyn (Lck/Yes-related novel tyrosine kinase) [55] et Btk (Bruton's tyrosine Kinase) [56]. Les érythroblastes de souris *Lyn^{-/-}* n'expriment ni GATA-1 ni EKLF (Erythroid Krüppel-Like Factor), deux facteurs de transcription importants pour l'érythropoïèse, et ont une expression diminuée de STAT5 a et b. Elles présentent une anomalie de la différenciation érythrocytaire bloquée vers les stades BFU-E et CFU-E et une anémie [57]. Les souris invalidées pour Btk sont viables mais les progéniteurs érythroïdes de ces souris montrent une diminution de la phosphorylation de l'EPOR et de JAK2 et une diminution de leur capacité à s'auto-renouveler en condition de concentrations d'EPO et de SCF limitantes [56].

Les protéines STATs sont composées d'un domaine de liaison à l'ADN qui reconnaît la séquence consensus C-terminale TTC(N)3GAA ou GAS (Interferon-Gamma Activated Sequence). Cette séquence ADN possède un motif SH2 qui est reconnu par les STATs. Trois membres de la famille STAT sont impliqués dans la signalisation par EPO/EPOR : STAT1, STAT3 et STAT5 [58]. Le rôle de STAT5 au cours de l'érythropoïèse est mieux connu. Elle possède deux isoformes : STAT5a et STAT5b [59]. Les STAT5 a et b sont activées par de nombreux facteurs de croissance et cytokines. STAT5 régule l'expression de gènes codants pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (cycline G2, p27, Cdkn1,

Cycline D2) [60] ainsi que dans la captation du fer [61]. Mais elle est surtout impliquée dans la stimulation de facteurs anti-apoptotiques tels que Pim-1, Pim-3, Irs-2, Serphin-3G, Trb3 [62] et Bcl-XL (B-cell lymphoma-eXtra Large) [63]. L'expression de Bcl-XL augmente au cours de la différenciation érythroïde terminale car il est nécessaire à la survie des précurseurs érythroïdes [46][64]. Il inhibe la voie des caspases et empêche l'apoptose. Le promoteur du gène *Bcl-XL* possède des séquences de fixation pour le facteur de transcription GATA-1 [65]. En absence d'EPO la caspase 3 est activée, elle clive GATA-1 et Bcl-XL et les cellules entrent en apoptose. L'activation de l'EPOR entraîne l'inhibition du clivage de Bcl-XL par la caspase 3 [46]. Les érythroblastes des souris invalidées pour STAT5 a et b ont une diminution d'expression protéique de Bcl-XL et un taux d'apoptose élevé [63]. Ces souris meurent *in utero* vers J13 du fait d'une anémie sévère et de graves anomalies du système nerveux central [63]. En revanche, la surexpression de Bcl-XL dans des lignées cellulaires ou des cellules primaires entraîne une différenciation érythroïde indépendante à l'EPO comme c'est le cas pour la maladie de Vaquez [66][67], d'où la nécessité que ces processus soient bien régulés. En conclusion, l'EPO et la voie JAK/STAT5 permettent la différenciation et la survie des érythroblastes.

- **La voie phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et protéine kinase B (AKT) (Figure 8)**

PI3K est un hétérodimère constitué d'une sous-unité régulatrice (p85) et d'une sous-unité catalytique (p110). L'EPOR peut activer la voie PI3K de deux manières, soit en recrutant directement la sous-unité régulatrice p85 soit indirectement par interaction avec les protéines adaptatrices Cbl, GAB1 (GRB2 Associated Binding Protein 1), GAB2 (GRB2 Associated Binding Protein 2), IRS-2 (Insulin Receptor Substrate 2) et VAV [68][69][70]. L'activation de la PI3K entraîne une augmentation de l'expression des cyclines D3, E et A ainsi que du récepteur c-Kit dans des progéniteurs érythroïdes humains [71]. La cascade d'activation induite par l'interaction SCF/c-Kit favorise la prolifération des progéniteurs érythroïdes. L'activation de la PI3K par phosphorylation induit une activation de la protéine kinase B (AKT) *via* un second messenger le phosphatidylinositol-triphosphate (PIP3).

Les cibles de l'AKT sont impliquées dans la survie, la prolifération ou l'apoptose des cellules érythroïdes. Ces sont les facteurs de transcription de la famille «forkhead» (FOXO3a, FKHR-L1), la protéine pro-apoptotique Bad, la protéine kinase GSK3 (Glycogen Synthetase Kinase 3), les facteurs de transcription GATA-1 et la survivine [72]. La phosphorylation de FOXO3a par l'AKT inhibe son activité transcriptionnelle pro-apoptotique. Ces cibles sont les gènes codants pour les protéines apoptotiques FASL et Bim (Bcl-2-like protein 11) [73].

AKT inactive également la protéine pro-apoptotique Bad (Bcl-2-associated death promoter protein) qui inhibe Bcl-XL en la séquestrant [74]. La voie AKT peut être activée par la signalisation l'EPO/EPOR mais aussi par l'interaction SCF/c-Kit. AKT augmente l'activité transcriptionnelle de GATA-1 en le phosphorylant, ce qui favorise la différenciation érythroïde [75]. L'inhibition de la GSK3 par AKT protège les érythroblastes de l'apoptose même en absence d'EPO [72]. L'AKT induit une inactivation des caspases 3 et 9 et inhibe également l'apoptose en activant la survivine qui appartient à la famille des inhibiteurs d'apoptose et qui inhibe l'activité des caspases [76]. Enfin l'AKT favorise l'expression de l'iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) qui inhibe la NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate H⁺) oxydase responsable de la production de formes réactives de l'oxygène (FRO) [77].

- **La voie RAS-MAP kinase (Figure 8)**

Après stimulation par l'EPO, la voie Ras est activée de deux façons : soit directement *via* la protéine Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2), un adaptateur protéique qui est capable de se lier à JAK2 grâce à son domaine SH2, soit indirectement par interaction de Grb2 avec les tyrosines phosphatases SHC et SHP2. Ces deux mécanismes entraînent une cascade d'activation qui débute avec la translocation dans le cytoplasme de la protéine SOS (Son of Sevenless) qui active la protéine Ras. Il existe trois homologues de Ras et c'est surtout K-Ras qui est important au cours de l'érythropoïèse. Ras active Raf1 et cette activation stimule le domaine catalytique de plusieurs kinases MAPK (Mitogen Activator Protein kinase), parmi lesquelles les protéines ERK (Extracellular Regulated Kinase 1 et 2 ou p42/p44), le complexe protéine kinase SAPK (Stress-activated protein kinase)/Jnk et la protéine p38. Cette cascade d'activation aboutit à l'induction de l'expression de gènes tels que *c-FOS*, *c-MYC* et *c-JUN* qui stimulent la prolifération cellulaire.

La voie ERK est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire dans les précurseurs érythroblastiques. Au cours de l'érythropoïèse précoce, les kinases ERK 1 et 2 participent à l'expansion du compartiment de progéniteurs érythroïdes immatures en favorisant leur prolifération au détriment de leur différenciation terminale [78]. Les kinases ERK pourraient aussi contrôler l'activité des caspases et maintenir l'expression de Bcl-XL [79]. La voie JNK (Jun Kinase) joue également un rôle dans la survie cellulaire et la prolifération des progéniteurs érythroïdes immatures [80]. JNK active par phosphorylation les protéines Jun qui font partie du complexe transcriptionnel AP-1 (Activator protein 1) avec les protéines FOS. AP-1 régule des gènes du cycle cellulaire et favorise ainsi la prolifération quand la

cellule n'est pas déprivée en facteurs de croissance. L'expression de *c-JUN* dans les cellules érythroïdes retarde l'apoptose [81]. La voie p38 MAPK est impliquée de façon indirecte dans la régulation de l'érythropoïèse. Les souris invalidées pour le gène *p38α* meurent majoritairement pendant l'embryogenèse et les animaux qui survivent ont une anémie sévère liée à une forte diminution de l'expression de la protéine EPO. Cependant, les progéniteurs issus des souris *p38α*^{-/-} se différencient normalement en présence d'EPO [82].

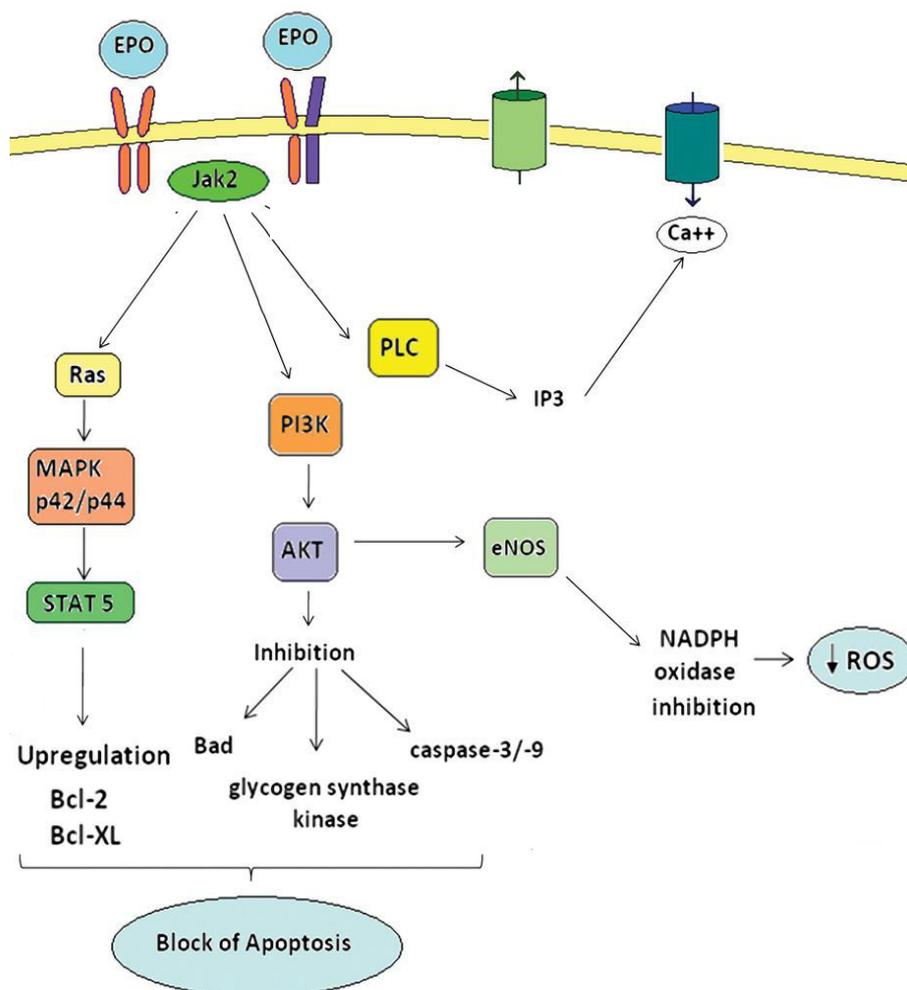


Figure 8. Les différentes cascades de régulation induites par l'activation de l'EPOR par l'EPO (d'après Mastromarino et al. [77])

- **Régulation du calcium intracellulaire par l'EPO (Figure 8)**

L'activation de l'EPOR induit une augmentation de l'import de calcium dans la cellule. TRPC2 (Transient Receptor Potential cation Channel 2) est très exprimé à la surface des érythroblastes et serait l'importeur du calcium. Cette voie de régulation passe par la phospholipase C (PLC) et requiert l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) comme messenger secondaire. Il a été montré que TRPC2 possède un récepteur à l'IP3 [82]. Le calcium est important pour la prolifération et la différenciation cellulaire qu'il favorise en contribuant à la

modulation de l'expression de proto-oncogènes qui stimulent la prolifération cellulaire comme c-Myc, à la phosphorylation de facteurs de transcription et à l'activation de la calcineurine qui a un effet anti-apoptotique [50].

- **Régulation négative de l'EPOR par les phosphatases et les SOCS**

L'activation de l'EPOR par l'EPO est très transitoire, car une régulation négative de l'EPOR se met très rapidement en place. Cela aboutit à l'internalisation de l'EPOR, à l'inhibition de la phosphorylation des tyrosines du récepteur et à sa dégradation. La partie C-terminale de l'EPOR est ubiquitinylée rapidement après la fixation de l'EPO et est dégradée par le protéasome. Le reste de l'EPOR est internalisé et adressé aux lysosomes pour être dégradé. Ces événements ont lieu à la surface cellulaire et requièrent l'activation de JAK2 [83]. Plusieurs phosphatases sont impliquées dans le processus de déphosphorylation d'EPOR mais il semble que SHP-1 joue un rôle prédominant. SHP-1 possède un domaine SH2 [84]. En plus des phosphatases, des protéines de la famille SOCS suppriment le signal de prolifération envoyé par les cytokines anti-apoptotiques, en particulier SOCS-1, CIS (Cytokine-Induced STAT inhibitor) et SOCS-3. SOCS-1 inhibe l'activation de JAK2. SOCS-3 s'associe à l'EPOR et à JAK2 pour inhiber leur activité. CIS, qui possède un domaine SH2, est recruté par l'EPOR et réprime la prolifération [85]. Enfin, la protéine Lnk (Lymphocyte-specific adapter protein) jouerait aussi un rôle important dans cette régulation négative de l'EPOR en favorisant l'apoptose cellulaire mais les mécanismes exacts de son action sont à élucider [86].

C.2.3/ Les facteurs chimiques qui favorisent l'érythropoïèse (Figure 9)

La différenciation des CSHs en globules rouges requiert des facteurs exogènes qui sont essentiels aux cellules aux différents stades de maturation (**Figure 9**). Ces cytokines sont produites essentiellement par les cellules stromales de la niche hématopoïétique comme les fibroblastes, les adipocytes, les cellules endothéliales et les macrophages, mais aussi par d'autres organes comme le foie et le rein [87].

De la CSH jusqu'aux CFU-E, la prolifération et la survie cellulaire sont dépendantes du stem cell factor (SCF) produit par les cellules stromales et expriment son récepteur c-Kit. c-Kit est très exprimé à la surface des cellules hématopoïétiques CD34⁺ jusqu'au stade BFU-E où son expression est maximale puis diminue progressivement pour ne plus être exprimé au stade polychromatophile. L'invalidation de c-Kit chez la souris entraîne la mort *in utero* due à une anémie sévère [88]. La liaison du SCF à c-Kit induit sa dimérisation et son

autophosphorylation. Le récepteur à tyrosines kinases recrute différentes protéines à domaine SH2 comme PLC- γ , les enzymes Ras-GTPases, la sous-unité p85 de la PI3K, SHP2, GRB2, GRB7 et shc. La voie SCF/c-Kit induit plusieurs cascades de signalisation comme les voies PI3K, MAPK et la voie protéine kinase C dont toutes les conséquences ne sont pas connues mais qui promeuvent toutes la prolifération et la survie cellulaire. De plus, le SCF a un effet synergistique avec l'EPO dont il potentialise le signal [87][88][89].

A partir du stade CFU-E, la différenciation érythroïde est sous le contrôle de l'EPO et nécessite un apport de fer dans les érythroblastes pour la synthèse d'hème et la production d'hémoglobine en coordination avec la vitamine B6 [90] et les vitamines B9 et B12 qui sont importantes pour la synthèse d'ADN [91]. D'autres cytokines sont importantes. Il s'agit des interleukines 3, 6, 8, 9 et 11 et du GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) qui favorisent la prolifération des progéniteurs érythroïdes. Enfin, d'autres molécules favorisent l'érythropoïèse, il s'agit du facteur de croissance à l'insuline 1 qui favorise la prolifération en synergie avec les autres cytokines [92], les glucocorticoïdes qui sont efficaces en cas d'érythropoïèse de stress [93], de l'angiotensine 2 rénale qui favorise la synthèse d'EPO par le rein [94] et de la thrombopoïétine synthétisée par le foie qui favorise la prolifération des BFU-E [87].

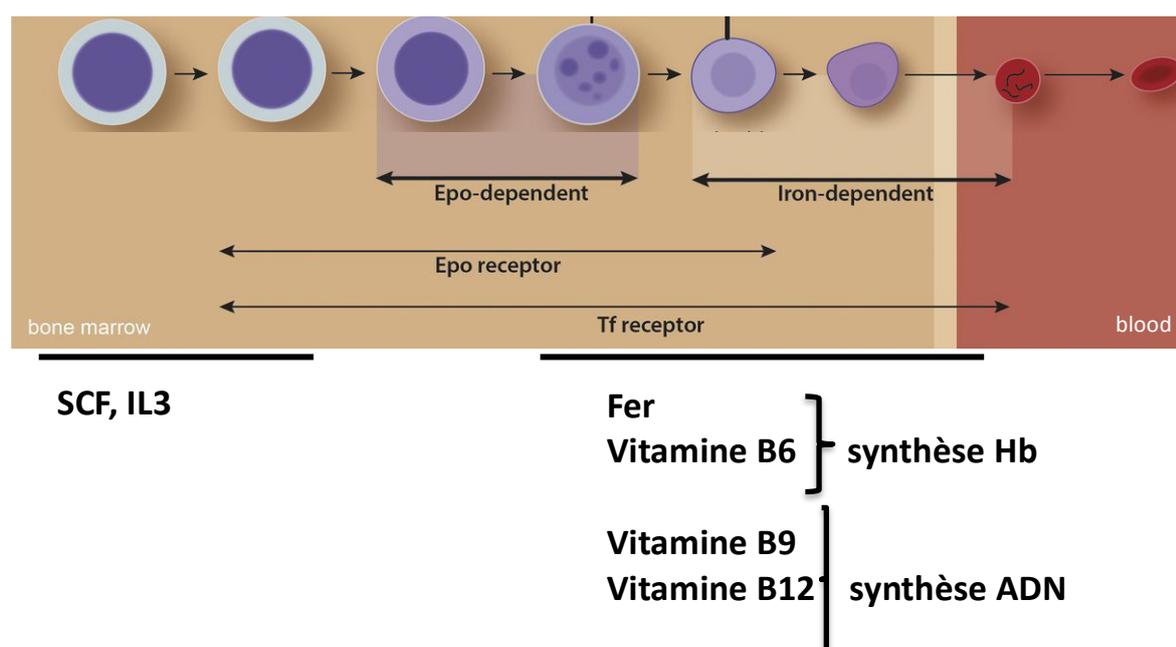


Figure 9. Les différents facteurs exogènes nécessaires à la différenciation érythroïde (d'après Gassmann et al. [21]).

C.2.4/ Les cytokines qui régulent négativement l'érythropoïèse

Il existe un nombre important de pathologies dans lesquelles l'érythropoïèse est inhibée. Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués touchant toutes les étapes de la régulation de l'érythropoïèse qui est très complexe. L'inflammation peut aboutir à la mise en place d'une anémie chronique dans l'organisme. Les cytokines inflammatoires peuvent réprimer l'érythropoïèse en stimulant la synthèse d'hepcidine [95] ou en diminuant la sensibilité des érythroblastes à l'EPO [96]. Ces cytokines sont le TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) qui module la voie NF-KB pour induire une apoptose des progéniteurs immatures [97], l'INF- γ (interféron γ), qui a un rôle indirect sur l'apoptose en favorisant l'expression de FAS et FASL et la synthèse de céramide [98] et le TGF- β 1 (Transforming Growth Factor β 1) qui accélère la maturation mais inhibe la prolifération des progéniteurs érythroïdes [99].

C.2.5/ Rôles des protéines chaperonnes au cours de l'érythropoïèse

Les protéines chaperonnes ont un rôle important au cours de l'érythropoïèse, notamment au cours de l'activation d'EPOR où elles protègent les érythroblastes de l'apoptose [100]. L'expression des protéines HSPs est induite par une augmentation de la température ou d'autres stress. Les protéines HSCs (Heat Shock Cognate) sont des analogues des HSPs et sont exprimées constitutivement. Les chaperonnes ont différents rôles, elles protègent leurs cibles de la dénaturation, de l'agrégation, de l'ubiquitinylation, et elles favorisent leur maturation mais elles peuvent aussi favoriser la dégradation de protéines [100].

Plusieurs groupes ont mis en évidence une accumulation importante HSP70 (Heat Shock Protein 70) dans les précurseurs érythroïdes suggérant un rôle important de HSP70 au cours de l'érythropoïèse [103][104][105]. HSP70 est une protéine chaperonne de 70 Kda contenant deux domaines : un domaine N-terminal de liaison à l'ATP et un domaine C-terminal d'interaction avec ses protéines cibles. Les protéines HSP40, HSP110, CHIP, HOP, HIP, BAG-1 et BAG-3 ont été identifiées comme des co-chaperonnes potentielles de HSP70 capables de réguler son activité [106]. La régulation de HSP70 lors de la transduction du signal EPO/EPOR et son rôle dans la protection de GATA-1 a été étudiée par l'équipe du Pr Hermine (Institut Imagine, Hôpital Necker, Paris). En cas de déprivation en EPO, HSP70 est exportée du noyau et ne protège plus GATA-1 qui est alors clivée par la caspase 3 induisant un arrêt de maturation et une apoptose [107][108]. D'autre part, Hsp90 et Hsc70 participent au repliement de HRI (Heme Regulated Kinase) qui fait le lien entre l'hème et la traduction des ARNm de globines (voir partie régulation de l'érythropoïèse par l'hème). Ces interactions

sont nécessaires pour que HRI soit fonctionnelle. De plus, Hsc70 pourrait directement moduler l'activité de HRI en réduisant son activité de kinase et en favorisant ainsi la traduction protéique [109]. La globine α est elle aussi protégée par une chaperonne appelée AHSP (α Hemoglobin-Stabilizing Protein) qui se lie aux chaînes de globines α libres, leur permettant de garder leur conformation et de participer à leur assemblage dans l'hémoglobine. La β -thalassémie est une hémoglobinopathie causée par un déficit de synthèse des chaînes de globines β induisant une accumulation et une agrégation toxique des chaînes de globines α dans les cellules érythroïdes. Dans la β -thalassémie, AHSP change la conformation des hémoglobines α en une forme "bis-histidyl" plus stable dans laquelle le fer est oxydé et lié par deux histidines à la partie peptidique, limitant ainsi partiellement la production de FRO due à l'agrégation des chaînes α [110]. D'autre part, la caspase 3 est activée physiologiquement au cours de la différenciation érythroïde terminale qu'elle favorise. Bien que GATA-1 soit une cible de la caspase 3, il a été montré que GATA-1 n'est pas clivée durant la différenciation érythroïde terminale car il est protégé dans le noyau par sa protéine chaperonne HSP70 [108]. D'autre part, il a aussi été montré dans des cellules CD34⁺ humaines que GATA-1 est bien réprimée en fin de différenciation érythroïde de façon physiologique mais que ce processus implique la protéine HSP27 qui facilite son ubiquitinylation [112]. Récemment, il a été montré dans des érythroblastes de patients β -thalassémiques en fin de différenciation que HSP70 interagit avec les chaînes de globines α dans le cytoplasme, et n'est donc plus capable de protéger GATA-1 qui est clivée par la caspase 3 induisant un arrêt de la maturation érythroïde et une apoptose. La transduction d'une protéine HSP70 couplée à une séquence NLS d'adressage au noyau ou d'une forme mutante de GATA-1 inclivable par la caspase 3 permet de restaurer la différenciation terminale et la survie cellulaire des érythroblastes de patients β -thalassémiques [111]. Le rôle de HSP70 dans l'apoptose a beaucoup été étudié. Il a été montré chez la souris que HSP70 interagit avec la protéine AIF (apoptosis-inducing factor) qu'elle séquestre prévenant ainsi l'apoptose [113]. L'invalidation de l'isoforme HSP70.2 dans les cellules germinales des souris mâles induit une infertilité et une apoptose des spermatozoïdes [114]. Il a été montré également dans des cellules de patients atteints de leucémie myéloïde aiguë que la surexpression de HSP70 induit une augmentation d'expression de Stat5 et son activation permettant ainsi d'augmenter l'expression de Bcl-XL et de diminuer l'apoptose observée dans ces cellules. A l'inverse, l'inhibition de la voie PI3K induit une diminution d'expression de HSP70 et de STAT5 [115]. Dans des cellules de patients myélodysplasiques, il a été montré que HSP70 ne pouvait pas aller dans le noyau et donc que GATA-1 est dégradée. La transduction d'une forme phosphorylée de HSP70 permet de restaurer son transport dans le

noyau et de diminuer l'apoptose dans ces cellules [116]. La phosphorylation de HSP70 sur la sérine 400 est induite par un traitement à l'EPO et est nécessaire pour sa localisation nucléaire et la protection de GATA-1 [116].

De la même manière, on sait que HSP90 est la chaperonne de JAK2. Dans les syndrômes myéloprolifératifs comme la maladie de Vaquez, JAK2 est constitutionnellement activée. Inhiber JAK2 ou HSP90 dans les cellules de patients permet de diminuer la prolifération incontrôlée des cellules [117]. AKT et pRb sont aussi deux protéines chaperonnées par HSP90 [106]. Les expériences d'inactivation de HSP90 dans les modèles animaux montrent que HSP90 est importante pour la différenciation et la survie cellulaire [106]. Enfin, HSP70 et HSP90 régulent le repliement du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) qui favorisent l'érythropoïèse mais aussi sa translocation au noyau après liaison avec son ligand. Ce complexe multiprotéique augmente l'affinité du GR pour son ligand et le protège de l'agrégation et de la dégradation [101][102].

Pour conclure, les protéines chaperonnes HSP70 et HSP90 sont très importantes au cours de l'érythropoïèse. Elles régulent et protègent plusieurs protéines majeures de l'érythropoïèse comme GATA-1, JAK2, AKT et la globine α . Ce sont des protéines ciblées par de nombreux traitements en essais cliniques pour différentes leucémies [106] et qui devront être envisagées dans le futur pour le traitement de certaines dysérythropoïèses.

C.3/ Régulations génétiques

L'érythropoïèse nécessite un enchaînement de plusieurs cascades de signalisation qui impliquent des facteurs de transcription et en particulier GATA-1 qui joue un rôle majeur dans la différenciation érythropoïétique. Peu de facteurs de transcription sont spécifiques d'une lignée hématopoïétique donnée. En revanche, il existe des gènes exprimés au cours de l'érythropoïèse qui ont des séquences *cis* spécifiques au niveau de leur promoteur. C'est l'association de ces éléments en *cis* avec d'autres facteurs en *trans* (dont des facteurs de transcription) qui influe sur l'engagement dans une lignée plutôt qu'une autre [118].

C.3.1/ Séquences en *cis* impliquées dans la régulation des gènes exprimés au cours de l'érythropoïèse

Deux séquences en *cis* sont connues pour la régulation des gènes exprimés au cours de l'érythropoïèse. La première séquence appelée motif GATA (5'A/T GATA A/G 3') est la séquence de fixation de GATA. Pour les gènes érythroïdes tels que les gènes des globines ou

de GATA-1 lui-même, elle est associée avec un GT ou une CACC-like séquence alors que dans la lignée mégacaryocytaire elle est associée à un site de fixation ETS [119]. Certains gènes érythroïdes tels que les gènes de l'ALAS2, la première enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème et des globines possèdent également dans leur promoteur une séquence 5' TGAC/GTCAGCA 3' qui est importante pour leur transcription [120].

C.3.2/ Les facteurs *trans*-régulateurs de l'érythropoïèse

Beaucoup de protéines interviennent dans les régulations génétiques au cours de l'érythropoïèse comme éléments *trans*-régulateurs, activateurs ou répresseurs de la transcription. Leur fonction dépend du complexe protéique auquel elles vont prendre part.

- **GATA-1 et GATA-2**

GATA appartient à la famille des facteurs de transcription en doigts de zinc qui possèdent tous un motif GATA et deux motifs en doigts de zinc (Cys-X₂-Cys-X₁₇-Cys-X₂-Cys) qui permettent l'interaction à l'ADN en C-ter, et la stabilisation du complexe GATA/ADN en N-ter. On connaît six isoformes de GATA et uniquement deux d'entre elles sont exprimées au cours de l'érythropoïèse : GATA-1 et GATA-2. GATA-2 intervient au cours de l'érythropoïèse précoce et son expression diminue au fur et à mesure que celle de GATA-1 augmente (**Figure 10**). Schématiquement on peut dire que GATA-2 intervient dans la prolifération cellulaire des progéniteurs alors que GATA-1 régule la maturation et la différenciation des précurseurs. GATA-2 inhibe la transcription de GATA-1 et inversement [121].

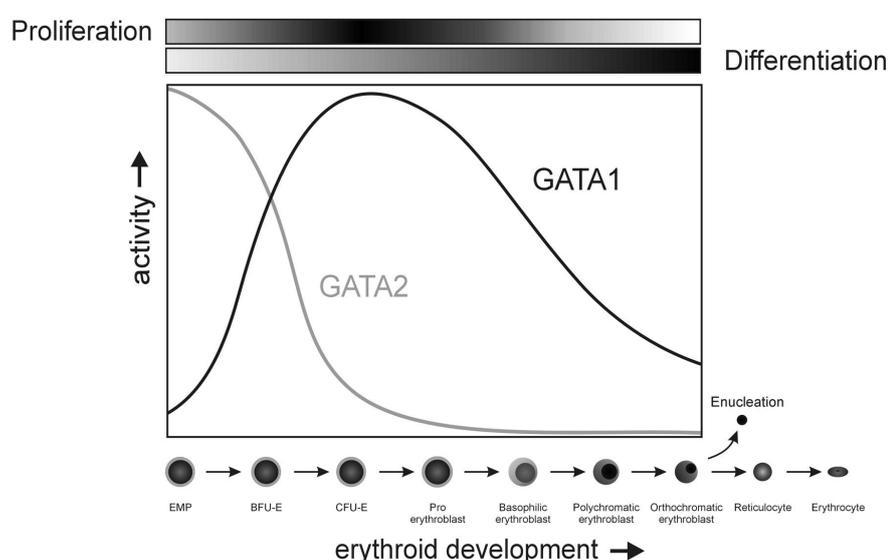


Figure 10. Profils d'expression des facteurs de transcription GATA-1 et GATA-2 au cours de l'érythropoïèse (image Ferreira et al. [121]).

Le gène *GATA-1* est localisé chez l'Homme sur le chromosome X. Au cours de l'hématopoïèse, son expression est restreinte aux lignées érythroïde, mégacaryocytaire, mastocytaire et éosinophile [122]. Les souris *gata-1^{-/-}* meurent rapidement (vers J10-J12). Elles sont anémiques et leur érythropoïèse est bloquée au stade proérythroblaste. Les souris *gata-1^{low/low}* ont les mêmes symptômes mais survivent grâce à une expansion plus importante des proérythroblastes [123]. L'activité transcriptionnelle de GATA-1 dépend de son interaction avec d'autres partenaires protéiques comme FOG-1 (Friend of GATA-1), Lmo-2 (LIM domain only 2), TAL1 (T-Cell Acute Lymphocytic Leukemia 1), Gfi-1b (Growth Factor Independent 1B transcription repressor), PU-1, CREB-binding protein (CBP), LDB1, MeCP1 (complexe constitué de MBD2 (methyl-DNA binding protein), p66/p68, et du complexe Mi-2/NuRD mais aussi de modifications post-traductionnelles comme l'acétylation, la phosphorylation et la sumoylation. Lorsque GATA-1 est acétylé par la protéine p300/CBP (CREB-binding protein ou cAMP response element binding protein), il s'homodimérise et s'active. GATA1 peut faire partie de complexes activateurs (GATA-1/FOG-1 et GATA-1/TAL-1/LDB1) ou répresseurs de la transcription (GATA-1/FOG-1/MeCP1 ou GATA-1/Gfi-1b) en fonction de ses partenaires. Par exemple, on sait que le complexe GATA-1/FOG-1/ MeCP1 inhibe la transcription de *GATA-2* et donc favorise celle de *GATA-1* [122]. On sait aussi que le complexe GATA-1/Gfi-1b induit un arrêt des divisions cellulaires en réprimant la transcription de gènes induisant la prolifération tel que *c-MYC* [124].

GATA-1 assure la survie cellulaire des érythroblastes en activant la transcription de la protéine anti-apoptotique Bcl-XL [125]. Il régule également leur différenciation, car c'est le facteur de transcription de plusieurs protéines clés de l'érythropoïèse comme les globines α et β , la première enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème l'ALAS2 et probablement aussi de la dernière enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème, la ferrochélatase en coordination avec les facteurs de transcription NF-E2 (Nuclear Factor Erythroid-derived 2) et SP1 (Specificity Protein 1). GATA-1 est aussi le facteur de transcription du récepteur à l'EPO (EPOR) et de la glycophorine A (GPA) constitutive de la membrane du globule rouge. De plus, il active sa propre transcription en se fixant sur les boîtes GATA de son promoteur [126].

- **FOG-1**

FOG-1 (Friend of GATA-1) est le co-facteur le plus important de GATA-1. C'est une protéine à domaines en doigts de zinc également qui interagit avec le domaine en doigts de zinc de la partie N-terminale de GATA-1. Ce co-facteur recrute d'autres protéines pour

moduler l'activité de GATA-1 [127]. Il est co-exprimé avec GATA-1 dans les lignées mégacaryocytaire et érythroïde dont il régule la différenciation. L'inhibition de l'interaction entre FOG-1 et GATA-1 est responsable d'une anémie létale chez la souris et d'une anémie avec dysérythropoïèse chez l'homme ainsi qu'une thrombopénie [128].

- **PU-1**

Le facteur de transcription PU-1 ou SPI-1 (famille des protéines ETS) est un répresseur de GATA-1 et de l'érythropoïèse. Il est indispensable au développement des progéniteurs lymphoïdes B et T ainsi que des monocytes et granulocytes. PU-1 empêche l'acétylation de GATA-1 et donc son activation en inhibant l'activité de la protéine p300/CBP. De plus, son domaine ETS lui permet de se lier au domaine de liaison à l'ADN de GATA-1 et d'inhiber son activité transcriptionnelle. Enfin, PU-1 peut former un complexe transcriptionnel répressif, qui occupe les promoteurs des gènes cibles de GATA-1, lorsqu'il recrute des protéines comme pRb (Retinoblastoma protein), des histones méthyl-transférases comme Suv39H et des protéines de l'hétérochromatine. Cependant PU-1 est exprimée faiblement au cours de la différenciation érythroïde et n'est plus détectable dans les stades tardifs [129].

- **TAL-1 et Lmo-2**

La protéine TAL-1 (T cell acute leukemia) ou SCL (Stem Cell Leukemia) appartient à la famille des facteurs de transcription à domaine bHLH (basic helix-loop-helix). Elle est constituée de deux hélices α séparées par une boucle qui permet sa dimérisation. Le domaine bHLH comprend aussi un domaine riche en acides aminés basiques situé en N-terminal qui est responsable de la liaison à l'ADN sur une séquence consensus CANNTG appelée « boîte E ». Lmo-2 (LIM domain only 2) est facteur nucléaire. Les souris *tal-1*^{-/-} et *Lmo-2*^{-/-} ont le même phénotype : anémie létale durant le développement fœtal [130]. Ces deux protéines appartiennent à un complexe transcriptionnel avec GATA (GATA/LDB1/Lmo-2/TAL-1/E2A) qui permet l'activation de la transcription de la plupart des gènes de protéines impliquées dans l'érythropoïèse. Quand c'est GATA-2 qui est dans le complexe, la transcription de c-kit est activée pour assurer la prolifération des progéniteurs tandis que quand c'est GATA-1 qui est dans le complexe, la transcription de gènes impliqués dans la différenciation des précurseurs comme les globines est activée. Le complexe protéique se pose entre le motif GATA et la boîte E, l'ensemble assurant une stabilité conformationnelle au complexe qui permet le repliement de l'ADN [131] (**Figure 11**).

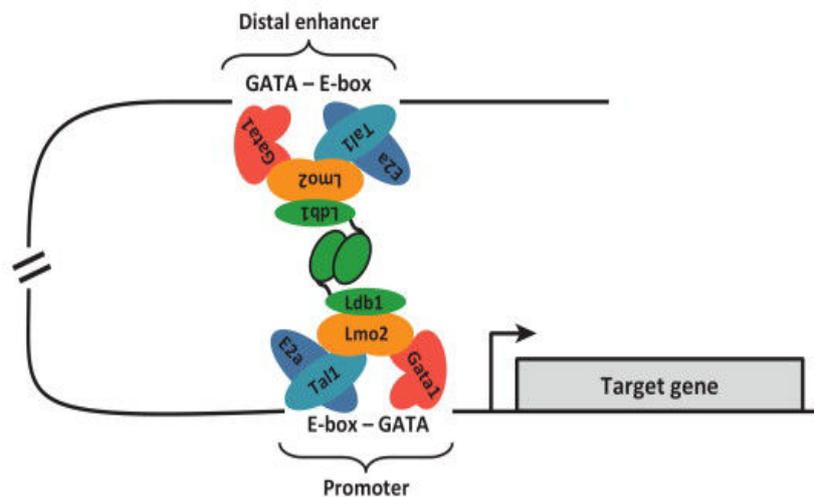


Figure 11. Le complexe transcriptionnel activateur (GATA/LDB1/Lmo-2/TAL-1/E2A)
(image Love et al. [131])

- **EKLF et NF-E2**

EKLF (Erythroïd Kruppel-Like Factor) est un facteur de transcription à doigt de zinc, qui interagit avec une haute affinité avec le motif *cis* CACCC [132] qui est retrouvé par exemple dans le promoteur de la globine β . Des mutations de cette séquence *cis* ou du gène *EKLF* entraînent une β -thalassémie [133]. EKLF joue un rôle majeur dans le passage entre l'hémoglobine foetale et l'hémoglobine adulte. NF-E2 (Nuclear Factor Erythroïd 2) est un facteur de transcription de type leucine zipper. C'est un hétérodimère constitué de deux sous-unités protéiques de 45 et 18 kDa. La sous-unité de 45 kDa n'est retrouvée que dans les cellules érythroblastiques, mégacaryocytaires et dans les mastocytes [134] et contient le domaine de transactivation tandis que la sous-unité 18 kDa contient le domaine de liaison à l'ADN qui reconnaît la séquence TGCTGA(G/C)TCA. Ce motif est également retrouvé dans le promoteur du gène de la globine β . Sa fixation à l'ADN permet le recrutement de l'ARN polymérase II et l'activation de la transcription. Au cours de la différenciation érythroïde, NF-E2 est nécessaire à la synthèse de l'hémoglobine. Recruté au niveau du LCR du cluster des gènes de globines avec ses co-facteurs de type Nrf (NF-E2 related factor), il est indispensable à la production maximale de la globine β dans les cellules érythrocytaires matures chez la souris [135]. Tandis que la souris invalidée pour la sous-unité de 45 kDa donne un phénotype érythroïde mineur, l'inactivation de la sous-unité de 18 kDa aboutit à une anémie létale, ce qui démontre l'importance du complexe NF-E2 au cours de l'érythropoïèse [134].

D/ Les métabolismes de l'hème et du fer

D.1/ L'hème

D.1.1/ Définition

L'hème (ou ferroprotoporphyrine IX) est composé d'une molécule de protoporphyrine IX (PPIX) associée à un atome de fer sous forme ferreuse Fe (II) (**Figure 12**). Le fer ferreux lie les quatre atomes d'azote du noyau tétrapyrrole par quatre liaisons de coordination.

L'hème s'associe à de nombreuses apoprotéines pour former les hémoprotéines. Ces hémoprotéines ont pour fonctions principales le transport et le stockage de l'oxygène (hémoglobine et myoglobine), le transport d'électrons (cytochromes de la chaîne respiratoire) et les réactions d'oxydo-réduction (cytochromes P450, catalase, peroxydase, cyclooxygénase,...) [136].

Cinq classes d'hème existent : a, b, c, d et d1 [137]. L'hème b constitutif de l'hémoglobine est lié de façon non-covalente à l'apoprotéine. Les autres types d'hème dérivent de l'hème b par modification des chaînes latérales permettant la formation d'une liaison covalente avec l'apoprotéine (exemple le cytochrome c de la chaîne respiratoire mitochondriale).

D.1.2/ Structure de l'hémoglobine

L'hémoglobine humaine adulte est un tétramère protéique constitué de quatre chaînes polypeptidiques identiques deux à deux : deux chaînes de globines alpha et deux chaînes de globines bêta ($\alpha_2\beta_2$). Dans la poche hydrophobe de chaque globine est logée une molécule d'hème (**Figure 12**).

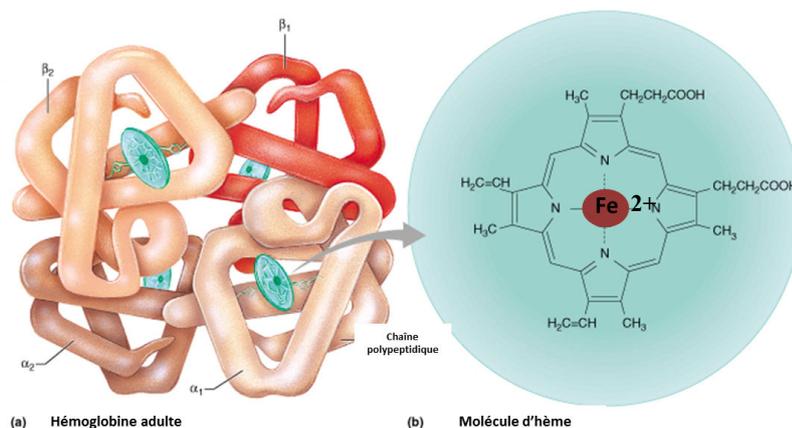


Figure 12. Structure de l'hémoglobine et de l'hème (d'après Benjamin Cummings)

D.1.3/ La biosynthèse de l'hème et son transport dans l'organisme

Les fonctions biologiques de l'hème et des hémoprotéines dans les cellules sont diverses et importantes pour la survie cellulaire, ce qui explique que la synthèse d'hème est quasi-ubiquitaire à l'exception des globules rouges matures dépourvus de mitochondries. Parmi les principales hémoprotéines on peut citer l'hémoglobine et la myoglobine qui permettent le transport et le stockage de l'oxygène dans l'organisme, les cytochromes qui sont impliqués dans le transport d'électrons et le métabolisme énergétique et les catalases qui sont des peroxydases hémiques qui catalysent la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène. La moelle osseuse et le foie sont les principaux producteurs d'hème, qui est utilisé essentiellement pour la synthèse de l'hémoglobine par les érythrocytes de la moelle osseuse et des cytochromes P450 par les cellules du foie [136]. La synthèse d'hémoglobine par les précurseurs érythroïdes est relativement stable et représente 80% de l'utilisation totale d'hème par l'organisme tandis que la synthèse hépatique des cytochromes P450 est inductible et varie en fonction des besoins des cellules [138]. L'hème a des fonctions régulatrices dans les cellules neuronales [139] et surtout érythroïdes [140]. Au cours de l'érythropoïèse, l'hème régule la transcription de plusieurs gènes qui contiennent une séquence *cis* spécifique HRE (Heme Responsive Element) [141]. L'hème régule aussi la dégradation du facteur de transcription Bach1, qui est un répresseur transcriptionnel des globines et de l'hème oxygénase 1 (HMOX1) [140]. Il régule ainsi son propre catabolisme en activant la transcription de l'enzyme HMOX1 qui permet sa dégradation. L'hème peut aussi agir sur la traduction protéique en régulant l'activité de la protéine kinase HRI (Heme Regulated Kinase) [142] ou en favorisant la dimérisation de la protéine DGCR8 (DiGeorge critical region-8) qui est impliquée dans la régulation de miARN importants au cours de l'érythropoïèse [143]. Enfin, l'hème a un rôle important dans l'homéostasie du fer : deux tiers des apports journaliers en fer sont ingérés sous forme de fer hémique.

D.1.3.1/ La biosynthèse de l'hème

La biosynthèse de l'hème procède en huit étapes enzymatiques décrites par Shemin, Rittenberg et Neuberger entre 1946 et 1955 [144][145]. Cinq étapes ont lieu dans la mitochondrie et trois étapes sont cytosoliques (**Figure 13**).

- **Etape 1**

La première enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème est l'ALAS (acide Δ -aminolévulinique synthase). L'isoforme 1 ALAS1 dont le gène est porté par le chromosome 3 est ubiquitaire tandis que la deuxième isoforme ALAS2 dont le gène est porté par le

chromosome X est impliquée dans la synthèse de l'hème au cours de l'érythropoïèse [146]. L'ALAS catalyse une réaction entre une glycine et un succinyl coenzyme A produit par le cycle de Krebs pour former l'acide Δ -aminolévulinique (ALA). Cette réaction nécessite un cofacteur, le phosphate de pyridoxal qui est un dérivé de la vitamine B6.

- **Etapes 2 à 7**

Les molécules d'ALA sortent de la mitochondrie pour rejoindre le cytosol, par un mécanisme encore inconnu. L'ALAD (acide Δ -aminolévulinique déhydratase) catalyse la condensation de deux molécules d'ALA pour former le PBG (porphobilinogène), un monopyrrole au cours de la deuxième réaction de cette voie de biosynthèse.

Au cours de la troisième étape, l'HMBS (hydroxyméthylbilane synthase) ou PBGD (PBG déaminase) catalyse la condensation de quatre molécules de PBG pour former un tétrapyrrole linéaire instable, l'hydroxyméthylbilane (HMB).

L'UROS (uroporphyrinogène III synthase) est la quatrième enzyme impliquée, elle catalyse la cyclisation et l'isomérisation de l'HMB pour former l'uroporphyrinogène III. Une cyclisation spontanée de HMB aussi a lieu. Elle aboutit à la production de l'isomère I de l'uroporphyrinogène.

Au cours de la cinquième étape, quatre chaînes carboxyliques de l'uroporphyrinogène III et de l'uroporphyrinogène I sont décarboxylées par l'UROD (uroporphyrinogène III décarboxylase) pour produire le coproporphyrinogène III et le coproporphyrinogène I.

Le coproporphyrinogène III à la différence de son isomère I est reconnu par les récepteurs mitochondriaux pour rentrer dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. La coproporphyrinogène III oxydase (CPO) catalyse la sixième étape en effectuant une double décarboxylation : celle du coproporphyrinogène III en hardéroporphyrinogène puis celle de ce dernier en protoporphyrinogène IX.

L'avant dernière étape de biosynthèse de l'hème est catalysée par la protoporphyrinogène oxydase (PPOX) qui est ancrée à la membrane interne de la mitochondrie. Il s'agit de l'oxydation du protoporphyrinogène IX en protoporphyrine IX (PPIX).

- **Etape 8**

La dernière étape consiste en l'insertion d'un atome de fer ferreux Fe (II) dans la PPIX par la ferrochélatase (FECH) produisant ainsi la molécule d'hème.

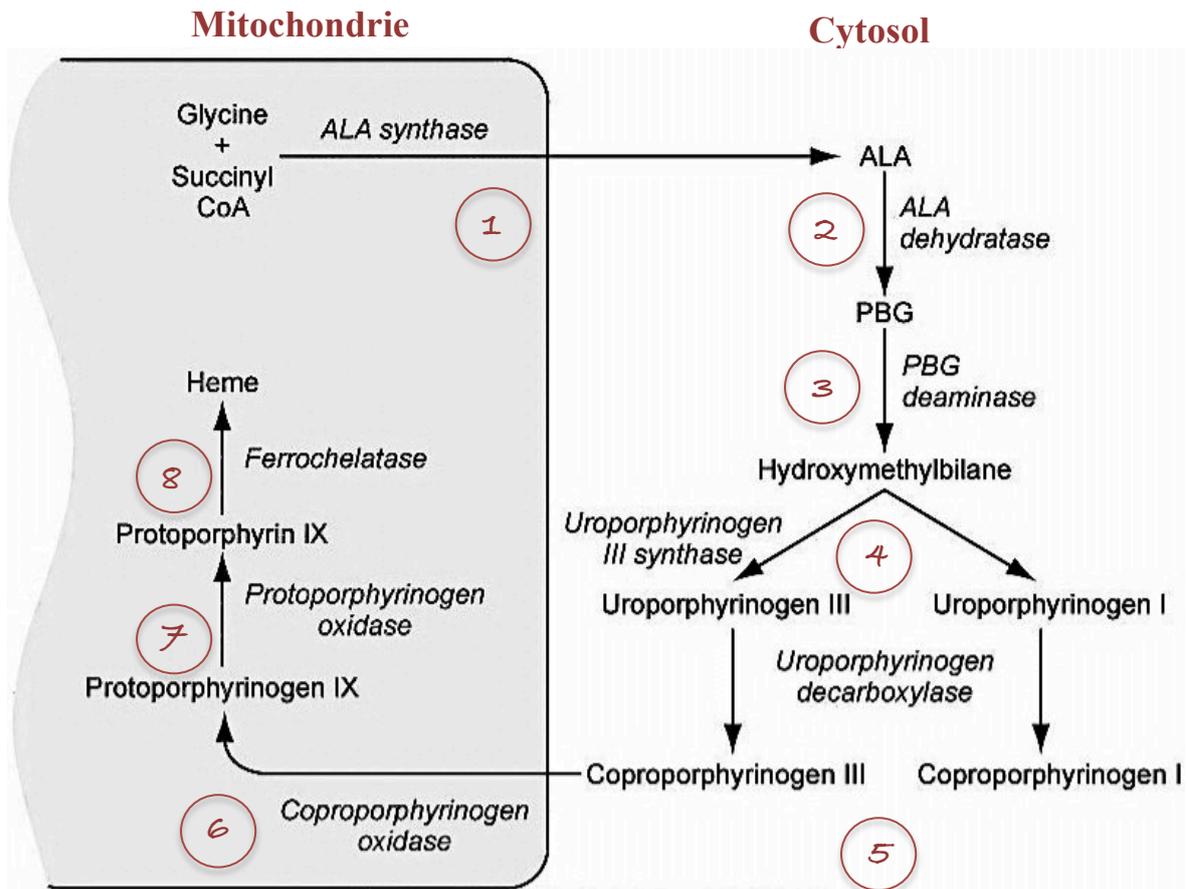


Figure 13. Les huit étapes de la biosynthèse de l'hème (d'après Mosby Elsevier)

D.1.3.2/ Le transport de l'hème dans l'organisme

- **Transport de l'hème dans le sang circulant (Figure 14)**

En cas d'hémolyse intravasculaire, une quantité importante d'hème est libéré dans le sang. Dans le sang, l'hème circule lié à une protéine cargo : l'hémopexine (HPX) [147]. L'hémopexine est une glycoprotéine synthétisée en majorité par le foie, mais elle est aussi synthétisée en moindre proportion dans le cerveau et la rétine [148]. Différentes publications montrent son rôle anti-oxydant [149][150]. En transportant l'hème dans le sang, elle prévient les dommages secondaires éventuels liés à la libération de l'hème dans la circulation et à son catabolisme comme le stress oxydatif et la mort cellulaire. L'hémopexine est une protéine de phase aiguë comme la ferritine. Sa synthèse augmente en réponse à l'inflammation mais aussi suite à des infections, au stress oxydatif et à la formation de néoplasies [149]. Bien qu'en pratique peu étudiée, l'hémopexine peut être quantifiée lors des anémies hémolytiques : sa concentration plasmatique reflète la quantité d'hème dans le sang de manière indirecte. Une concentration plasmatique d'hémopexine faible indique une dégradation importante d'hème

[151]. L'hème est transporté par l'hémopexine au foie. Le complexe hème-HPX est endocyté par le récepteur LRP1 (LDL receptor-related protein 1 ou CD91) exprimé à la surface de nombreuses cellules et seul ligand de l'hémopexine actuellement connu [152]. Le devenir de l'hémopexine dans l'hépatocyte est discuté, une équipe a montré que l'hémopexine est recyclée et libérée directement dans la circulation [153] alors qu'une autre équipe a montré une dégradation lysosomale de l'HPX [152].

L'albumine peut aussi transporter l'hème dans la circulation sanguine. L'albumine aurait plutôt un rôle de remplacement de l'hémopexine dans des conditions normales plutôt qu'un effet synergistique. Toutefois, le rôle de l'albumine dans le transport de l'hème est encore mal caractérisé [147].

- **Le transport de l'hème cellulaire (Figure 14)**

On sait relativement peu de choses sur le transport de l'hème dans les cellules et par quel processus il est incorporé aux globines dans les érythroblastes. Il existe plusieurs protéines candidates mais leur rôle n'est souvent pas très bien connu et leurs fonctions sont pléiotropes.

Transport de l'hème dans le cytoplasme

L'hème libre est cytotoxique. Le fer qu'il contient peut générer des formes réactives de l'oxygène (FRO) comme le radical hydroxyl, un des plus puissants oxydant connus par la réaction de Fenton. Il est hydrophobe et se fixe aux bicouches lipidiques de la cellule et des organites qu'il peut endommager. Il pourrait aussi avoir une fonction hémolytique dans l'hématie et altérer la conformation des protéines du cytosquelette, et induire l'inflammation [154]. L'hème doit donc être pris en charge dans des protéines chaperonnes dans le cytoplasme pour prévenir la formation de FRO et permettre son incorporation aux globines. Plusieurs protéines pourraient avoir cette fonction mais leur rôle n'est pas précisément connu. Il s'agit des glutathione S-transférases (GSTs), des protéines de liaison à l'hème (HBPs) et des protéines FABPs (fatty acid binding proteins). Les GSTs sont abondantes dans le cytoplasme et peuvent se lier à l'hème et aux porphyrines. Elles sont impliquées dans la détoxification de l'hème chez les helminthes [155]. Les protéines HBPs ont une plus grande affinité pour l'hème et les tétrapyrroles conjugués (par exemple HBP22 : $K_d = 26$ nM, HBP23 : $K_d = 55$ nM) que les protéines GSTs et FABPs (K_d compris entre 100 et 200 nM) [156]. L'expression de HBP23 est induite par l'hème et la PPIX dans des hépatocytes primaires de rat ou par le stress oxydant dans les macrophages péritonéaux [157]. Récemment, une étude a montré que le gène de la glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (*GAPDH*) possède sur son

promoteur une région de fixation pour l'hème [158]. Une autre étude a montré que la GAPDH permet l'insertion de l'hème dans l'hémoprotéine iNOS qui inhibe la production de FRO [159]. La fonction de la GAPDH dans le métabolisme de l'hème reste à explorer. Une autre protéine importante pour l'érythropoïèse pourrait jouer ce rôle avec iNOS. Il s'agit d'HSP90 dont le rôle de cargo intracellulaire pour l'hème reste à déterminer [160].

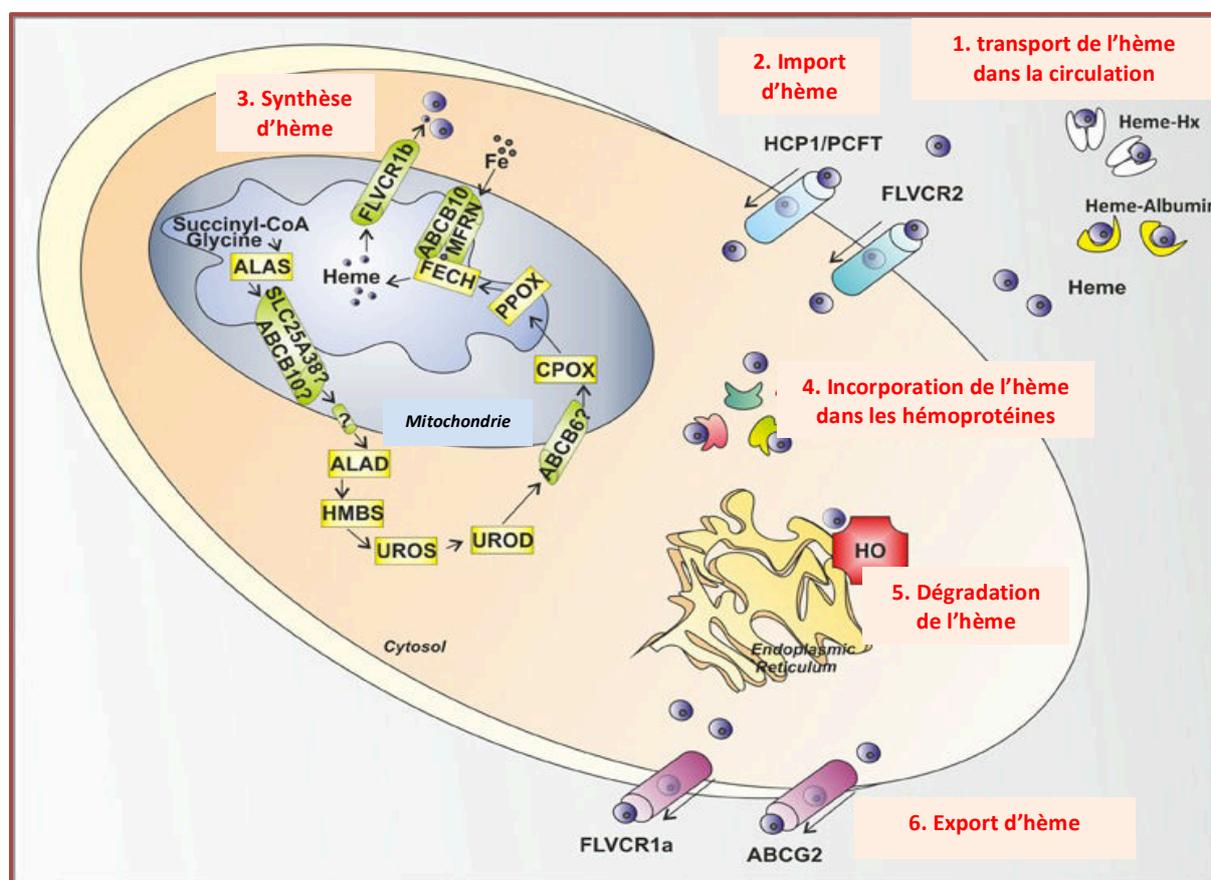


Figure 14. Le transport d'hème périphérique et cellulaire (d'après Chiabrando et al. [147])

L'import d'hème dans les cellules

Au niveau de l'érythroblaste, l'obtention d'hème par import n'est pas le mécanisme privilégié pour produire l'hémoglobine car l'essentiel de l'hème incorporé dans les globines est celui qui est néosynthétisé dans la mitochondrie. Les cellules produisent de l'hème mais peuvent aussi en importer.

- Les protéines HRG (Heme Responsive Gene)

Les protéines HRG1 et HRG4 ont été identifiées et caractérisées par l'équipe de Hamza chez le nématode *C.elegans* auxotrophe pour l'hème. Dans deux publications de 2008 et de 2013 [161] [162], cette équipe a montré que l'inactivation de *HRG1* chez le nématode aboutit à des défauts d'import de l'hème. Tandis que dans le modèle zebrafish, cela aboutit à

une érythroïèse inefficace qui peut être corrigée par un sauvetage grâce à un ADNc codant pour HRG1. HRG1 possède un orthologue chez l'homme (hHRG1 pour Heme Responsive Gene 1 homolog) qui est exprimé surtout dans le cerveau, le cœur, le muscle squelettique, le rein et les macrophages du système réticulo-endothélial rénal. hHRG1 semble essentielle pour l'export d'hème du phagolysosome vers le cytosol au cours de l'érythrophagocytose [162].

- Le complexe protéique HCP1/PCFT (Heme Carrier Protein 1/ Proton Coupled Folate Transporter)

Ce complexe protéique a été étudié par de nombreuses équipes et les données les plus récentes suggèrent qu'il s'agit surtout d'un transporteur de folates [163] [164]. Toutefois, il est exprimé dans le duodénum et le foie et peut transporter la zinc mésoporphyrine (ZnMP) et la zinc protoporphyrine (ZnPP), deux analogues de l'hème. Le complexe HCP1/PCFT constitue un bon candidat comme importeur d'hème alimentaire [163] [164].

- La protéine FLVCR2 (Feline Leukemia Virus Receptor de type 2)

FLVCR2 est codée par le chromosome 12 et possède 10 exons et 60% d'homologie avec FLVCR1 (féline leukemia virus receptor de type 1). Duffy et al. ont montré que FLVCR2 n'est pas un exporteur d'hème mais un importeur. FLVCR2 co-précipite avec l'hémine (un analogue de l'hème) et sa surexpression à la surface de cellules humaines augmente par deux la quantité de ZnMP et d'hème-Fe⁵⁵ importée dans la cellule. Cette protéine est exprimée dans le cerveau, le placenta, les poumons, le foie, les reins et le tissu hématopoïétique chez l'Homme. Des mutations de *FLVCR2* ont été identifiées chez les patients atteints du syndrome de Fowler. Ce syndrome entraîne une vasculopathie proliférative, une hydrocéphalie et des malformations des membres sans lien clairement établi avec le métabolisme de l'hème [165].

L'export cellulaire de l'hème

- La protéine ABCG2

La protéine ABCG2 (ou breast cancer resistance protein (BCRP) 2) a été décrite comme un exporteur possible de l'hème chez les mammifères [166]. ABCG2 est exprimée dans le tissu érythroïétique en particulier au cours de la phase précoce de l'érythroïèse et au début de l'hématopoïèse. ABCG2 interagit directement avec l'hème grâce à sa boucle extracellulaire 3 (ECL3) qui constitue un domaine de liaison aux porphyrines. Bien qu'il n'y ait pas de preuve directe qu'ABCG2 exporte l'hème, dans les cellules K562, ABCG2 peut

exporter la ZnMP. L'hème exporté serait pris en charge dans le sang par l'albumine [167]. Toutefois, ABCG2 est connu comme un exporteur de plusieurs molécules différentes et comme une protéine qui sert à la détoxification cellulaire, suggérant qu'il n'est pas spécifique de l'export d'hème. D'autre part, les patients qui ont une mutation homozygote dans le gène *ABCG2* ont une érythropoïèse normale [168].

- La protéine FLVCR1 (Feline Leukemia Virus Receptor de type 1)

FLVCR1 est un exporteur d'hème appartenant à la famille des transporteurs MFS (Major Facilitator Superfamily) dont le gène est localisé sur le chromosome 1 dans la région 1q31.3. FLVCR1 est exprimé dans différentes cellules hématopoïétiques incluant les érythrocytes et les macrophages et est faiblement exprimé dans le foie foetal, le pancréas et le rein. L'expression ectopique de FLVCR1 dans des K562 permet de réduire la quantité d'hème intracellulaire et permet l'efflux de la ZnMP [169]. Les souris invalidées pour *flvcr1* ont une érythropoïèse inefficace avec une surcharge en fer et meurent *in utero* [170]. Ces souris présentent des malformations caractéristiques de l'anémie de Blackfan-Diamond (ABD) (voir chapitre ABD). FLVCR1 serait capable d'interagir avec l'hémopexine. Il a été montré que l'export d'hème médié par FLVCR1 est cent fois plus efficace en présence d'hémopexine dans le milieu [171]. Alves et al. ont montré que dans des précurseurs érythroblastiques humains, HMOX1 est peu voire non exprimée et que les érythroblastes exportent leur hème *via* FLVCR1 plutôt que de le catalyser [172].

Deux isoformes de la protéine ont été décrites : FLVCR1a et FLVCR1b. Le gène possède 10 exons qui sont entièrement transcrits dans l'isoforme a, tandis que l'isoforme b possède un site alternatif de début de transcription sur l'exon 1 ce qui aboutit à son exclusion et à une protéine plus courte [173] (**Figure 15**). La protéine FLVCR1a possède 12 domaines transmembranaires et a été décrite comme un exporteur d'hème localisé à la membrane cytoplasmique des cellules [169][174]. Flvcr1b possède six domaines transmembranaires et serait un exporteur d'hème mitochondrial [173]. L'équipe du Dr Tolosano a identifié la forme b de FLVCR1. Lors d'expériences *in vitro* sur la lignée cellulaire K562, elle a montré que la surexpression de FLVCR1b augmente la quantité d'hème cytosolique tandis que l'inactivation de FLVCR1b produit une accumulation d'hème mitochondrial [173]. Contrairement aux résultats trouvés par l'équipe du Dr Abkowitz, l'équipe du Dr Tolosano a montré que l'inhibition de FLVCR1a mais pas de FLVCR1b chez la souris aboutit bien à des malformations squelettiques mais n'influe pas sur l'érythropoïèse. En revanche, la délétion de FLVCR1b perturbe l'érythropoïèse, ce qui suggère que la forme b de FLVCR1 uniquement est importante pour l'érythropoïèse. Le Dr Tolosano suggère que les résultats obtenus chez la

souris invalidée pour *FLVCR1* sont dûs à un déficit d'hème dans le cytosol plutôt qu'à son excès [173].

Des mutations du gène de *FLVCR1* ont été identifiées chez des patients atteints du syndrome d'ataxie du cordon postérieur-rétinite pigmentaire (PCARP) [175][176]. Cette maladie cause des anomalies du squelette et de la rétine pouvant entraîner des handicaps et une cécité. Les quatre mutations décrites ont abouti à une diminution de l'activité exportatrice d'hème de *FLVCR1* et à sa relocalisation à l'intérieur de la cellule dans les lysosomes [177]. Trois des quatre mutations sont localisées sur l'exon 1 et concernent donc la fonction de *FLVCR1a*, mais les patients n'ont pas d'anémie. Dans l'ABD, aucune mutation de *FLVCR1* n'a été mise en évidence [169] seulement des variations d'épissage (déletion d'exons) chez des patients mutés pour *RPS19* [178].

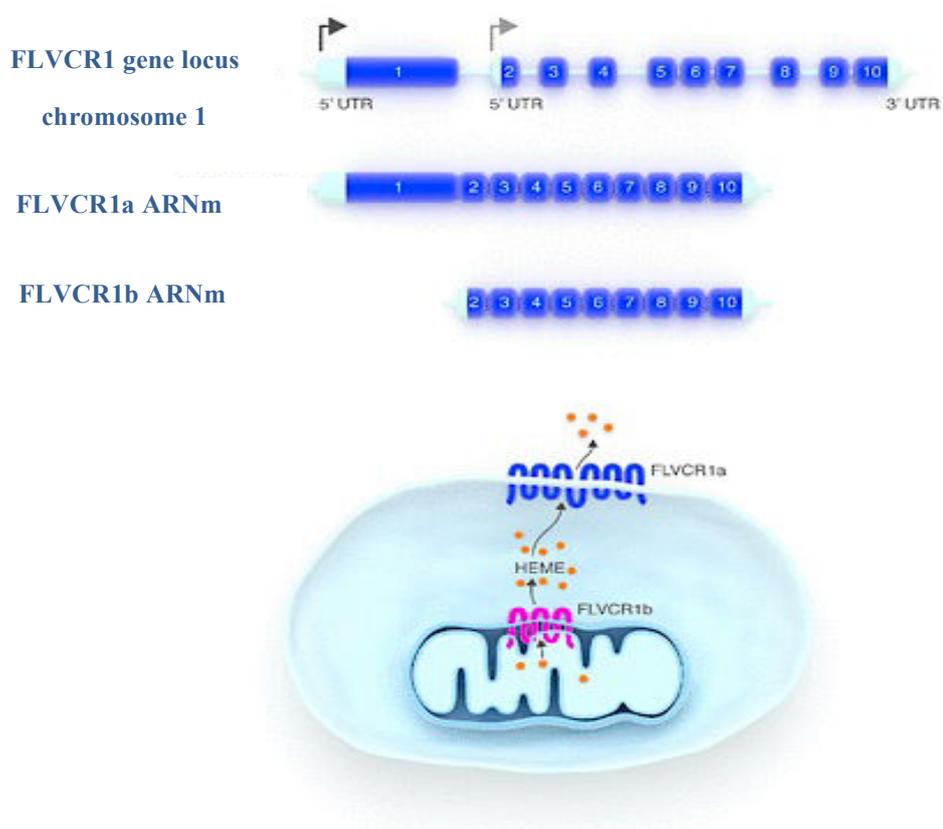


Figure 15. Les deux isoformes a et b de l'exporteur d'hème FLVCR1 et leurs rôles respectifs (image Chiabrando et al. [140])

D.1.4/ Le catabolisme de l'hème

- **Dégradation de l'hème dans les érythroblastes**

L'hème est essentiel à la production de l'hémoglobine, mais il est toxique quand il n'est pas complexé. L'hème libre entraîne une peroxydation des lipides membranaires ainsi

qu'une production de FRO qui ont des effets pro-apoptotiques dans la cellule [179]. S'il n'est pas utilisé, l'hème doit donc être dégradé ou exporté. Le catabolisme de l'hème dans les érythroblastes est assurée par l'hème oxygénase (HMOX1) qui catalyse l'oxydo-réduction de l'hème en biliverdine, monoxyde de carbone et fer (**Figure 16**) [180].

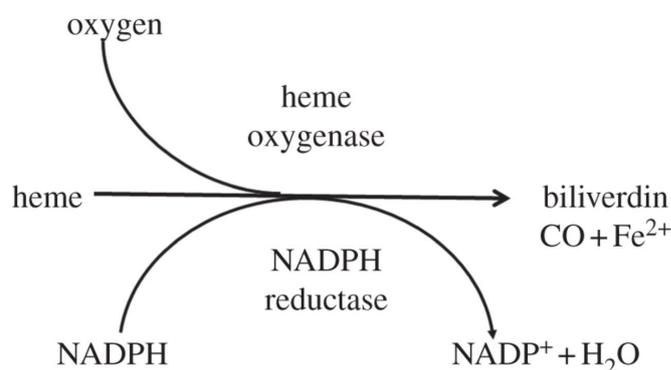


Figure 16. La réaction de dégradation de l'hème par l'hème oxygénase

L'hème oxygénase (HMOX) est localisée dans le réticulum endoplasmique des cellules. Il existe trois isoformes de HMOX : HMOX1, HMOX2 et HMOX3. HMOX2 est fortement exprimée dans le cerveau et les testicules et est constitutivement transcrite comme HMOX3, sans induction connue par l'hème [181]. HMOX1 est une isoforme inducible par l'hème qui induit ainsi sa propre dégradation *via* Bach1. HMOX1 est une enzyme ubiquitaire, fortement exprimée par les macrophages de la rate, de la moelle et du foie (organes assurant la dégradation des globules rouges) [182].

- **Les FRO**

Les FRO sont produites par le métabolisme cellulaire de l'oxygène et peuvent avoir des effets négatifs ou positifs dans la cellule en fonction de leur concentration. A de faibles concentrations, elles sont importantes dans des processus cellulaires tels que la mitogenèse et l'immunité. Mais à de fortes concentrations, elles induisent un stress oxydatif responsable d'une inflammation chronique et d'une toxicité cellulaire importante. Parmi des dérivés de l'oxygène on trouve l'ion superoxyde O_2^- , qui résulte de l'oxydation du dioxygène, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , l'oxyde nitrique NO, les radicaux (R) peroxydes ROO^- , l'ion peroxy-nitrique $ONOO^-$, l'acide hypochlorique HOCL et le radical hydroxyle $\bullet OH$. Les anions superoxydes sont indirectement toxiques en réagissant avec H_2O_2 et le monoxyde d'azote (NO), produisant respectivement des radicaux hydroxyles $\bullet OH$ (réaction de Haber-Weiss) et des peroxy-nitrites $ONOO^-$. La forme protonée des peroxy-nitrites est un puissant agent oxydant causant des dommages importants similaires à ceux observés avec $\bullet OH$. Les

radicaux peroxydes sont des radicaux secondaires issus de l'oxydation de substrats organiques par le radical hydroxyle $\bullet\text{OH}$. Ils sont dotés d'un pouvoir oxydant important mais inférieur à celui de $\bullet\text{OH}$. L'oxyde nitrique est issu de l'oxydation d'un atome d'azote de la L-Arginine. $\text{NO}\bullet$ peut réagir avec H_2O_2 pour former des dérivés nitriques toxiques. L'hème libre est une importante source de fer ferreux dans la cellule. Le fer ferreux peut réagir avec H_2O_2 pour produire du fer ferrique, l'ion hydroxyde et le radical hydroxyl par la réaction de Fenton. De nombreuses publications ont montré un effet délétère de l'hème libre dans la cellule dû au radical hydroxyle produit. Il induit l'apoptose cellulaire en favorisant la dégradation des lipides membranaires, des protéines et des acides nucléiques [351]. Un excès d'hème libre a été décrit dans plusieurs maladies comme la β -thalassémie et la malaria dans lesquelles il aurait une fonction hémolytique [351]. Les FRO sont des facteurs aggravants de nombreuses maladies, leur production est augmentée au cours de l'athérosclérose et l'anémie hémolytique microangiopathique [351].

- **Dégradation de l'hème des globules rouges sénescents**

La majorité des catabolites de la dégradation de l'hème provient de la dégradation de l'hémoglobine des globules rouges sénescents arrivés au terme de 120 jours en moyenne dans la circulation périphérique. Le catabolisme de l'hème implique plusieurs organes. Il commence dans la rate puis successivement prend place dans le foie, l'intestin pour finir dans le rein (**Figure 17**).

- Le système réticulo-endothélial de la rate

Les globules rouges sénescents sont phagocytés par les macrophages du système réticulo-endothélial de la rate principalement (mais une partie peut être dégradée par les macrophages de la moelle osseuse et les cellules de Küppfer du foie). Dans les macrophages, HMOX1 catalyse la dégradation de l'hème en fer, monoxyde de carbone (CO) et biliverdine (pigment vert). La biliverdine est transformée en bilirubine par l'action d'une réductase. La bilirubine non-conjuguée est insoluble. Dans la circulation sanguine elle est donc conjuguée à l'albumine qui la transporte vers le foie.

- Le foie/ la vésicule biliaire

Il existe un système de captation du complexe bilirubine-albumine qui permet à la bilirubine de pénétrer dans les hépatocytes au niveau de leur membrane sinusoïdale. Dans le cytoplasme hépatocytaire, la bilirubine est conjuguée à deux molécules polaires d'acide glucuronique pour la rendre plus hydrosoluble par la bilirubine-UDP-glucuronyl transférase.

La bilirubine conjuguée quitte l'hépatocyte et est éliminée dans le canalicule biliaire pour rejoindre l'intestin.

- L'intestin et le rein

Une fois dans l'intestin, la bilirubine conjuguée est dégradée en stercobiline (pigment brun) et en urobilinogène. La stercobiline est éliminée dans les fèces tandis que l'urobilinogène repasse dans le sang, est filtré par le rein, transformé en urobiline (pigment jaune) et éliminé dans les urines.

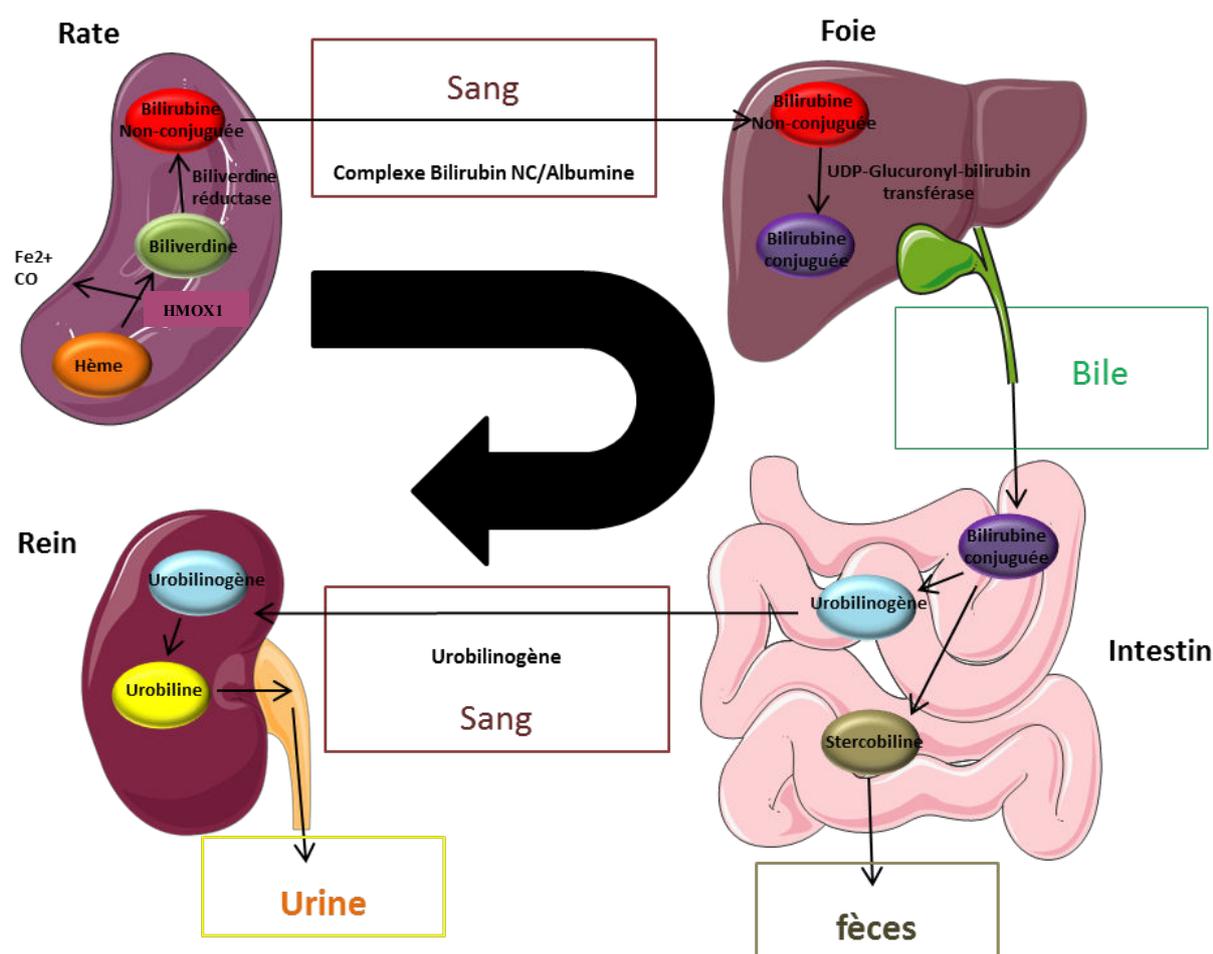


Figure 17. Le catabolisme de l'hème par l'organisme mobilise plusieurs organes

- Devenir des catabolites de l'hème

La biliverdine et la bilirubine ont des rôles antioxydants [182]. Le CO est un second messager neuronal [183]. Pour son élimination, il se lie à l'hémoglobine pour former la carboxyhémoglobine et être expiré dans l'air. Une partie du fer libérée est recyclée pour la synthèse de nouvelles molécules d'hème et l'autre partie est stockée par la ferritine des macrophages de la rate, de la moelle et du foie.

D.2/ L'entrée du fer dans les érythroblastes (Figure 18)

La transferrine possède deux sites de fixation spécifiques qui peuvent lier deux atomes de Fe (III) en présence de bicarbonate. La transferrine plasmatique peut être libre (apo-transferrine) ou liée à une ou deux molécules de fer (transferrine mono-ferrique et transferrine di-ferrique). Dans les conditions normales, le fer occupe uniquement 30% des sites de liaison (coefficient de saturation de la transferrine). La transferrine permet le transport du fer et son internalisation par les cellules. La transferrine di-ferrique se fixe sur son récepteur (Tfr1 ou CD71 codé par le gène *TFRC*) exprimé à la surface des érythroblastes. Tfr1 est un dimère de 2 sous-unités de 95 kD reliées par un pont disulfure. Il existe une isoforme du récepteur (Tfr2) qui est exprimée uniquement à la membrane des cellules du foie et des cellules érythroïdes tandis que l'expression de Tfr1 est ubiquitaire. La transferrine a 30 fois plus d'affinité pour Tfr1 que pour Tfr2 [184]. L'inactivation homozygote du gène *tfr1* chez la souris provoque une létalité embryonnaire par défaut d'érythropoïèse et à l'état hétérozygote, une anémie microcytaire hypochrome [185].

Le complexe CD71/transferrine est internalisé dans la cellule grâce à un complexe endosomal recouvert de clathrines [186]. La diminution du pH grâce à des pompes à protons ATPasiques au sein de l'endosome permet la libération du fer sous forme Fer (III). La réductase endosomale Steap 3 (6-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3) réduit le fer sous forme Fe (II) [187], ce qui permet son export par le transporteur DMT1 (divalent metal transporter 1 ou NRAMP2) [188].

La majeure partie du fer est utilisée dans la mitochondrie pour la synthèse d'hème. Les mécanismes exacts de l'entrée du fer dans la mitochondrie sont discutés. Dans le modèle « kiss and run », le fer est directement transporté de l'endosome à la mitochondrie [186] sans passage par le cytosol. Un contact direct a été démontré dans les réticulocytes [189]. Le fer serait importé dans la mitochondrie au niveau de la membrane interne grâce à la mitoferrine 1 (MFRN1 codée par le gène *SLC25A37*, chromosome 8), un transporteur de la famille SLC. Aucun transporteur de fer n'a été identifié à la membrane externe de la mitochondrie. L'étude *in silico* de données de microarray a permis d'identifier plusieurs transporteurs intra-mitochondriaux putatifs du fer : SLC25A39 (chromosome 17), SLC22A4 (chromosome 5) et TMEM14C (chromosome 6) [190]. L'inactivation de ces gènes chez le zebrafish entraîne le développement d'une anémie sévère. L'inactivation par siRNA de SLC25A39 dans des cellules MEL (mouse erythroleukemia cells) affecte l'incorporation du fer dans la PPIX [190] mais pas l'entrée du fer dans la mitochondrie.

Le fer qui n'est pas utilisé pour la synthèse d'hème dans la mitochondrie est stocké dans la ferritine. Plusieurs études ont démontré l'existence d'un pool de fer lié à des composés de bas poids moléculaires dans le cytosol, appelé pool de fer labile (LIP). Ce pool catalyse la production de FRO par réaction de Fenton et est impliqué dans la signalisation cellulaire et la régulation post-transcriptionnelle par le système IRE-IRP [191].

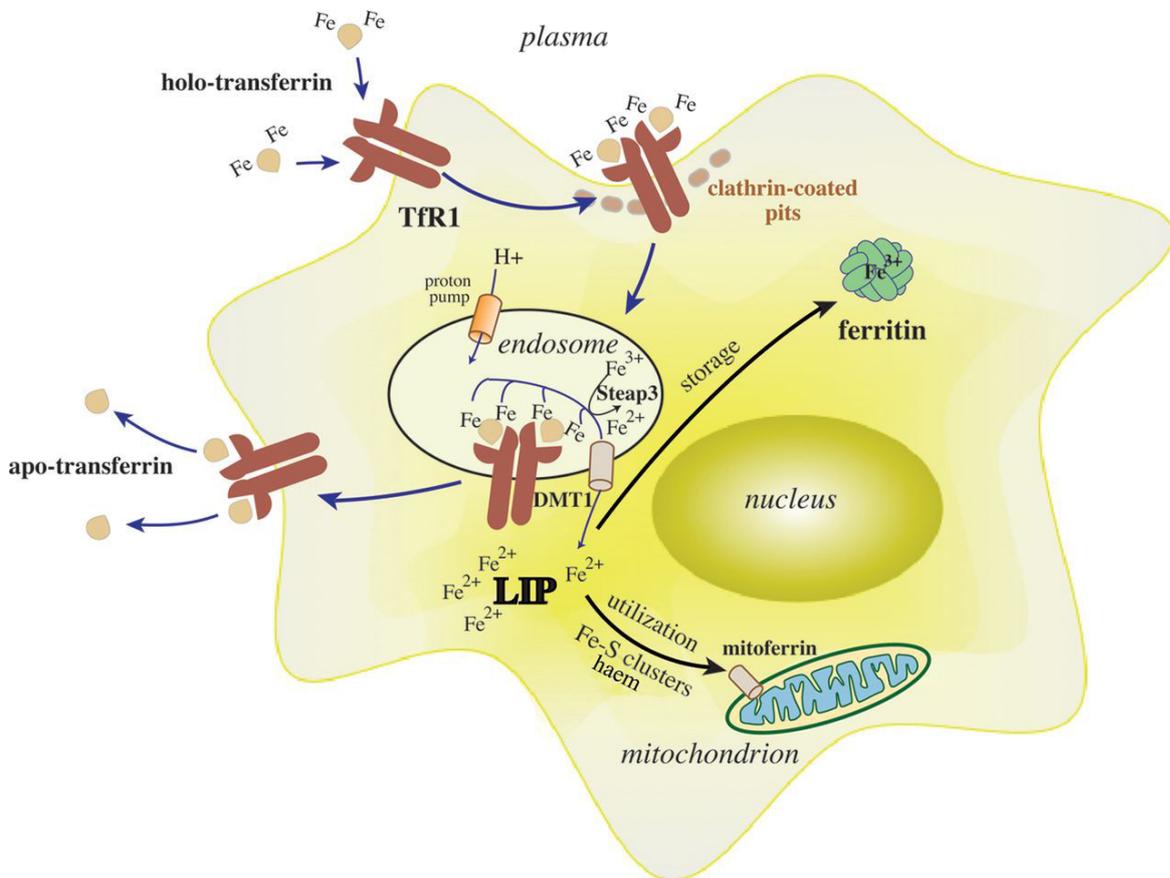


Figure 18. Acquisition du fer par les érythroblastes (d'après Wang et al. [185])

D.3/ Régulation de l'érythropoïèse par le fer et l'hème

D.3.1/ Régulation de l'érythropoïèse par le fer (Figure 19)

Le fer est un oligo-élément essentiel pour l'érythropoïèse. Le corps en stocke une partie mais le reste doit être apporté à l'organisme par l'alimentation. Le fer entre dans l'érythroblaste par internalisation de la transferrine plasmatique, via son récepteur CD71. Il peut alors être stocké dans la cellule par la ferritine ou être utilisé dans mitochondrie, où il sert de substrat pour la biosynthèse de l'hème et pour l'assemblage des centres fer-soufre (Fe-S). Dans le tissu érythroïde, le fer régule la synthèse d'hème directement car il est incorporé à l'hème par la ferrochélatase (FECH) mais il régule aussi l'ALAS2 et la FECH par d'autres mécanismes [186].

- **Régulation de l'ALAS2 par le système IRE/IRP**

Les IRPs (iron regulatory proteins) sont deux protéines cytosoliques qui possèdent environ 80% d'homologie entre elles. IRP1 est codée par le gène *IREB1* sur le chromosome 9 et IRP2 par le gène *IREB2* sur le chromosome 15 [181]. Elles interagissent avec les IREs (Iron Regulatory Elements), des motifs d'environ 30 nucléotides qui prennent une conformation tige-boucle avec un motif conservé CAGUGN (où N = U, C ou A). Ces motifs sont présents dans les régions non-traduites en 5' ou 3' d'ARNm spécifiques. Plusieurs protéines sont régulées par ce système : l'ALAS2, la ferritine et la ferroportine possèdent un IRE en 5' alors que TfR1 et DMT1 possèdent un IRE en 3' [185]. La fixation des protéines IRPs sur les IREs entraîne soit un blocage de l'initiation de la traduction (IRE en 5' non-codant) soit une stabilisation de l'ARNm (IRE en 3' non-codant) (**Figure 19**).

IRP1 a deux fonctionnalités. En présence de fer, elle se complexe avec un cluster fer-soufre Fe₄S₄ pour devenir l'aconitase ACO1. Si la concentration en fer dans la cellule devient insuffisante, l'aconitase se retrouve sous forme d'apoprotéine, c'est-à-dire sans cluster fer-soufre. Cette séparation provoque un réarrangement structural permettant à la protéine de reprendre une fonction d'IRP. Le site laissé vacant par le cluster permet la fixation sur l'IRE. IRP2 ne possède pas le caractère bi-fonctionnel d'IRP1 et serait le principal régulateur du métabolisme du fer lors de l'érythropoïèse. En présence de fer, la protéine est ubiquitinylée et dégradée. En cas de carence en fer, les IRPs se fixent aux IREs, ce qui permet de restaurer les réserves en fer de la cellule en stabilisant les ARNm des protéines permettant l'acquisition du fer (CD71, DMT1) et en diminuant la traduction des ARNm permettant son stockage (chaînes lourdes et légères de la ferritine), son utilisation (ALAS2) et son export (ferroportine). La ferroportine érythroïde échappe à cette régulation durant les premiers stades de différenciation des progéniteurs grâce à la production transitoire d'une isoforme sans IRE *via* un promoteur alternatif. Lors de la production des globines, l'expression de l'isoforme de la ferroportine possédant l'IRE est restaurée [192][193] (**Figure 19**).

- **Régulation de la FECH par les centres fer-soufre**

L'assemblage des centres Fe-S dans la mitochondrie est un mécanisme très conservé [194] qui nécessite une machinerie enzymatique complexe. Une protéine Fe-S est une protéine qui possède dans sa structure un cluster fer-soufre consistant en des groupes de deux, trois ou quatre atomes de fer oxydés liés à des anions sulfure S²⁻. Les clusters Fe-S servent de donneurs d'électrons au cours de nombreuses voies métaboliques (complexes de la chaîne respiratoire, cycle de Krebs) mais aussi pour la synthèse d'ADN. Outre ces fonctions

effectrices, les clusters fer-soufre pourraient aussi permettre à la cellule de stocker du fer en situation physiologique et seraient suppléés par la ferritine mitochondriale en cas de surcharge en fer. Ce stockage permettrait de limiter la production de FRO et de protéger la cellule. La ferrochélatase, dernière enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème possède un centre Fe_2S_2 sans lequel elle n'est pas fonctionnelle.

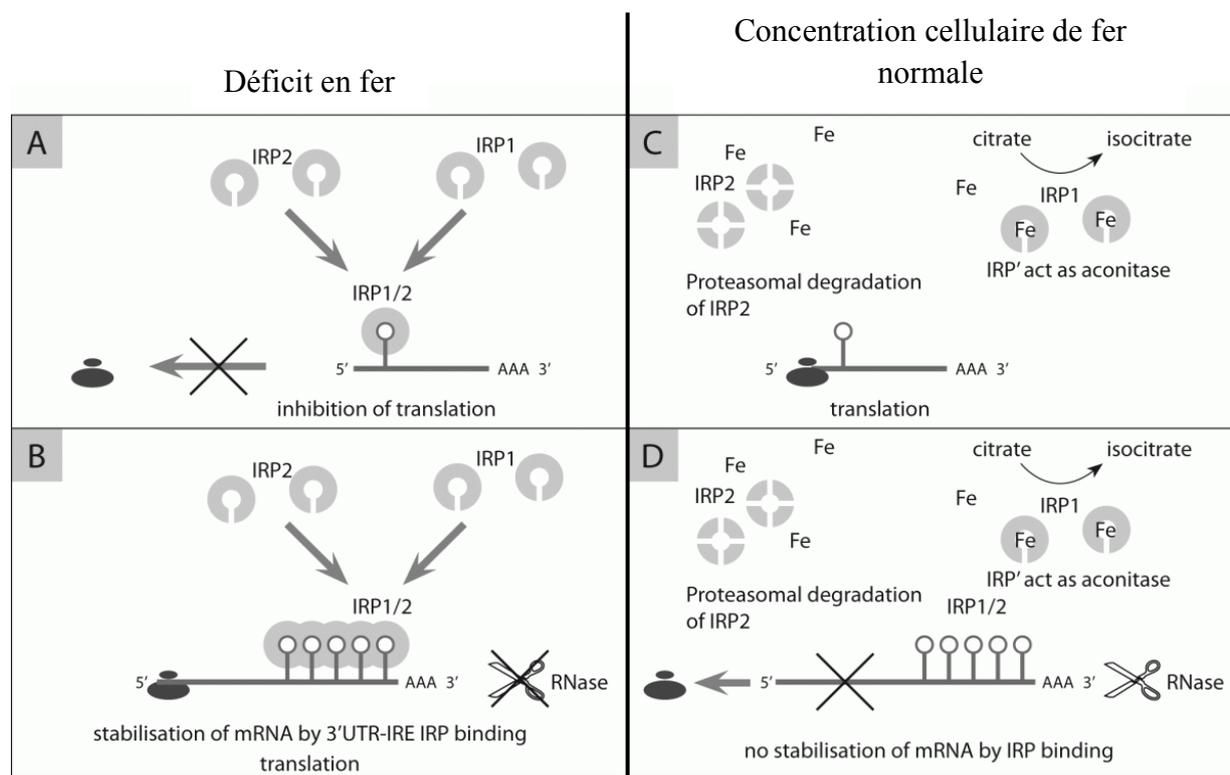


Figure 19. La régulation par le fer : le système IRE/IRP (d'après Tandara et al. [193])

D.3.2/ Régulation de l'érythropoïèse par l'hème

L'hème possède également une activité régulatrice sur l'érythropoïèse mais aussi sur son propre devenir. Ces régulations opèrent par des interactions hème/protéine grâce aux motifs de fixation à l'hème HRM (Heme Regulatory Motifs) constitués de cinq acides aminés dont un motif Cys-Pro conservé [195]. Il a été montré chez *C.elegans* que l'hème peut réguler directement la transcription de certains gènes comme ALAS1 en se fixant sur les éléments *cis* HRE (Heme Responsive Elements) [196].

- **Action de l'hème sur sa synthèse, sa dégradation et sur la transcription des globines**

L'ALAS1 qui est une enzyme ubiquitaire de la synthèse d'hème possède des motifs HRM. Il a été montré chez le rat que l'hème inhibe sa propre synthèse par inhibition de l'ALAS1 *via* les motifs HRM [195]. Cette inhibition passe aussi par une régulation

transcriptionnelle. Munakata et al. ont montré dans des fibroblastes qu'un traitement à l'hème sur ces cellules inhibait la translocation de ALAS1 dans la mitochondrie mais que cela n'avait pas d'effet sur ALAS2, suggérant, que cette dernière n'est pas régulée négativement par l'hème [195]. Plusieurs études ont confirmé qu'ALAS2 n'est pas réprimée par l'hème [146][197]. Cependant, l'hème peut moduler directement IRP2 qui possède un motif HRM [181]. Il a donc un effet indirect sur la régulation d'ALAS2 et de CD71 par ce biais, la disponibilité en fer favorisant la synthèse d'hème. En contrôlant la dégradation de IRP2, l'hème participe au contrôle de l'homéostasie du fer dans les progéniteurs érythroïdes.

Le facteur de transcription Bach1 (Btb And Cnc Homology 1) est aussi une cible de l'hème *via* son domaine HRM en C-ter. Bach1 interagit avec de petites protéines, les MAFs qui régulent la transcription de certains gènes en se fixant sur des séquences *cis*-spécifiques. Les MARE (MAF Recognition Elements) sont présentes sur les promoteurs de nombreux gènes de l'érythropoïèse tels que celui de l'hème oxygénase 1 (HMOX1), mais aussi les gènes des globines α et β [198] (**Figure 20**). En séquestrant les MAFs, Bach1 réprime la transcription de ces gènes [199]. Lorsque l'hème se fixe sur Bach1, il induit son export de la cellule, son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome [200][201]. Les MAFs se fixent alors au facteur de transcription érythroïde Nrf2 de la famille de NF-E2 (NF-E2 related factor 2) qui est stabilisé par l'hème permettant l'activation de la transcription des gènes cibles au niveau de MARE spécifiques : les ARE (Antioxydant Response Elements) [202]. Si la quantité d'hème est basse, la protéine KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) séquestre Nrf2 dans le cytoplasme [203]. Au contraire, le stress oxydatif induit par un excès d'hème provoque la dissociation du complexe KEAP1/Nrf2 et l'accumulation nucléaire de Nrf2 (**Figure 20**) [204].

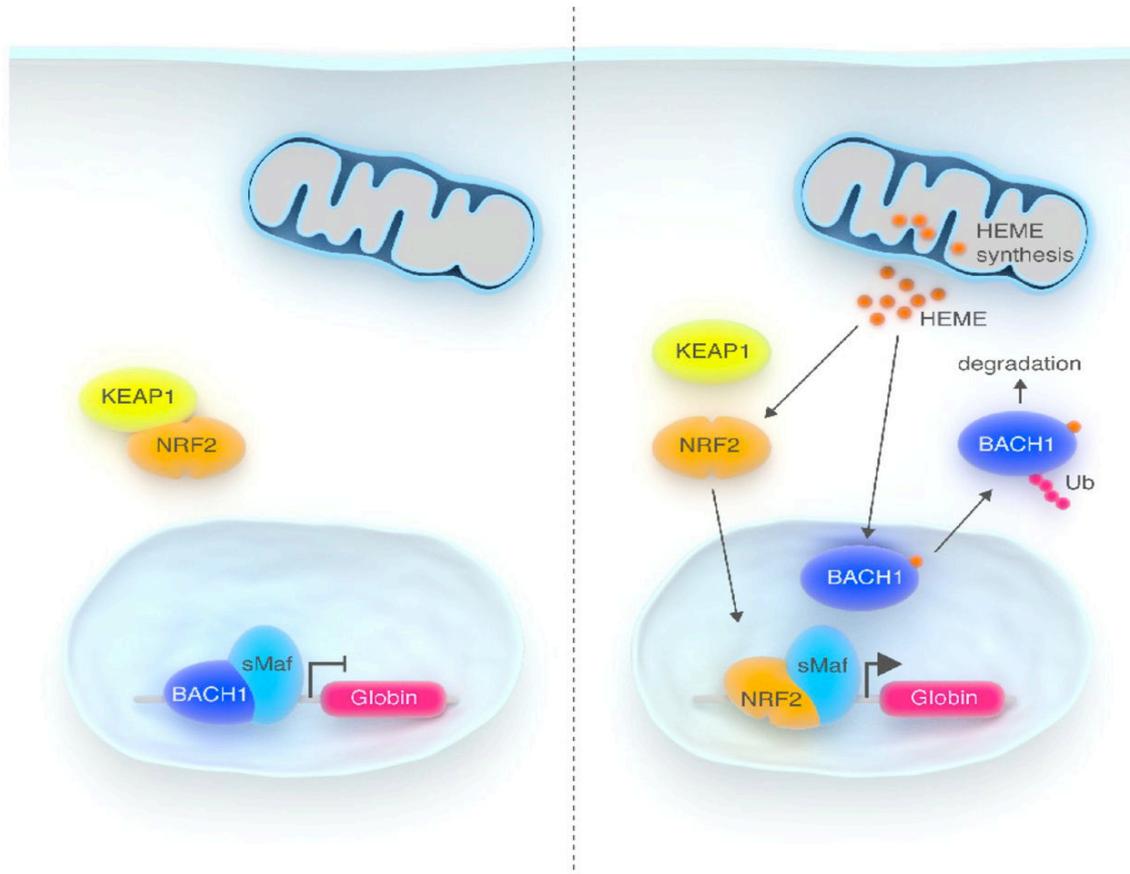


Figure 20. La régulation de Bach1 par l'hème (image Chiabrando et al. [140])

- **Action de l'hème sur la traduction protéique (Figure 21)**

La traduction protéique est dépendante de la sous-unité α du facteur EIF2 (Eukaryotic translation Initiation Factor 2) qui est composé de trois sous-unités (α , β et γ). EIF2 α est responsable du transport de l'ARN de transfert contenant la méthionine initiatrice de la traduction vers le ribosome. En absence d'hème, EIF2 α est phosphorylée par la protéine HRI (Heme Regulated Kinase) qui possède deux sites de fixation à l'hème et qui est exprimée surtout dans le tissu érythroïde [205]. EIF2 α phosphorylée ne sera plus fonctionnelle inhibant ainsi la traduction [142]. Quand la concentration d'hème est importante, les deux sites de fixation à l'hème sont occupés, ce qui modifie la conformation de HRI pour la rendre inactive. EIF2 α n'est pas phosphorylée et initie la traduction protéique. Dans le tissu érythroïde, la traduction des globines est très importante pour maintenir un équilibre avec la synthèse d'hème et former l'hémoglobine. L'hème lui-même est un des facteurs clés qui assure le maintien de cet équilibre.

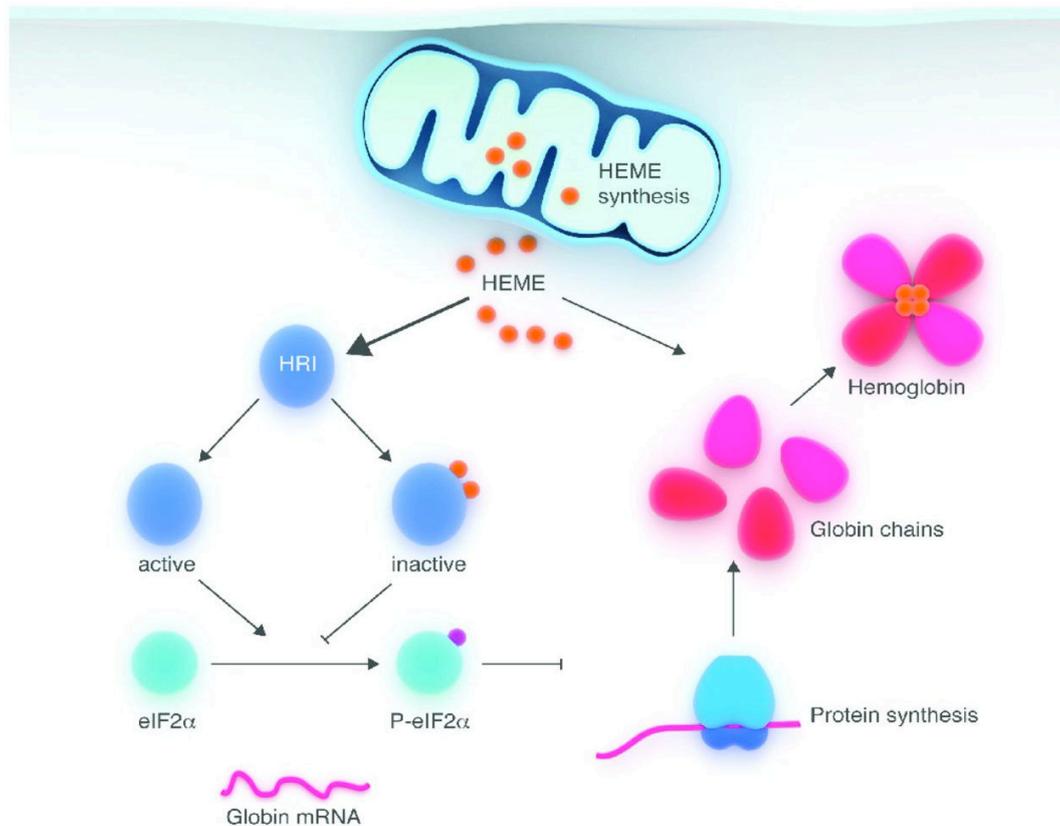


Figure 21. La régulation de HRI et de la traduction par l'hème (image Chiabrando et al. [140])

II/ L'anémie de Blackfan-Diamond (ABD) : une érythroblastopénie congénitale

A/ Caractéristiques épidémiologiques et cliniques de l'ABD

L'anémie de Blackfan-Diamond (ABD) a été décrite pour la première fois en 1936 par le Dr Josephs (deux patients) [206] suivi d'un rapport plus détaillé de quatre cas par les docteurs Kenneth Blackfan et Louis Diamond en 1938 [207]. Il s'agit d'une maladie constitutionnelle rare dont l'incidence est de 7 à 10 cas par million de naissances vivantes par an avec un sexe ratio égal à 1.

Le myélogramme d'un patient atteint par l'ABD montre une érythroblastopénie définie par l'absence ou moins de 5% d'érythroblastes au sein de la moelle, par ailleurs normocellulaire. Le nombre et la morphologie des plaquettes et des globules blancs sont le plus souvent normaux mais dans quelques cas, une variation du nombre de plaquettes (thrombocytopénie ou thrombocytose) ou une neutropénie (diminution du nombre de

polynucléaires neutrophiles) peuvent être détectés lors du diagnostic. Les hématies et les réticulocytes sont de grande taille (anémie macrocytaire), absents ou peu nombreux (anémie arégénérative). L'âge médian au moment du diagnostic est de 2 à 3 mois. Avant l'âge de 2 ans et 5 ans, 95 % et 99% des cas sont diagnostiqués [208] [209]. L'anémie se révèle chez le nourrisson par une pâleur cutanée, une dyspnée et une difficulté à la prise alimentaire. D'autres critères sont à prendre en compte pour le diagnostic de l'ABD :

- Les malformations

50% des patients présentent des malformations isolées ou associées entre elles et plus ou moins sévères [210]. Il s'agit de malformations de la tête (microcéphalie, microphthalmie, fente labiale ou palatine, hypertélorisme, cou court, mauvaise implantation des cheveux,...) ; des extrémités des membres (pouce triphalangé, bifide ou surnuméraire, éminence thénar plate, hypoplasie radiale,...) ; du tractus urogénital ; du squelette et du cœur [210-215]. Cependant, à l'exception du pouce triphalangé, ces malformations ne sont pas spécifiques à la maladie. Le retard de croissance présent dans environ 30% des cas fait partie du syndrome malformatif [210]. Il est encore aggravé par les effets secondaires des traitements (surcharge en fer des transfusions itératives et corticoïdes).

- Conservation de caractéristiques fœtales de l'érythropoïèse

La persistance du caractère fœtal des hématies au cours de l'ABD a été décrite par Diamond au cours de la maladie [216]. Le taux d'hémoglobine F reste anormalement élevé chez les patients atteints d'ABD (5% à 25% à 6 mois au lieu d'être inférieur à 1% à cet âge) mais n'est pas spécifique de cette maladie, car il est retrouvé dans d'autres insuffisances médullaires ou syndromes de défaillance de moelle osseuse hérités des anglosaxons (IBMFS) [217]. De même, l'antigène i, qui est normalement présent sur les globules rouges de sang de cordon, mais disparaît au cours de la première année de vie au profit de l'antigène I, persiste anormalement à la surface des érythrocytes des malades [218].

- Adénosine désaminase érythrocytaire (ADAe) élevée

95% des patients non-transfusés ont une élévation de l'ADAe, une enzyme clé de la voie des purines. L'élévation de l'ADAe est un bon marqueur prédictif de l'ABD et est spécifique à la maladie au regard des autres IBMFS [217] [219]. Les familles dans lesquelles un des parents a une élévation d'ADAe sont considérées comme des familles à transmission dominante et le parent qui a cette élévation de l'ADAe sans autre symptôme est considéré comme un phénotype silencieux [220].

Tous les critères majeurs pour le diagnostic des patients atteints d'ABD ont été définis lors d'une conférence consensus organisée par les Fondations « Daniella Maria Arturi Fondation » et la « DBA fondation » en 2006 à New York. Le tableau suivant les récapitule [221] :

Critères majeurs de diagnostique	<ul style="list-style-type: none"> • Age au diagnostic inférieur à 1 an • Erythroblastopénie isolée au sein d'une moelle osseuse d'aspect normal par ailleurs sur les autres lignées • Réticulocytopénie • Anémie macrocytaire et arégénérative
Critères mineurs de diagnostique	<ul style="list-style-type: none"> • Présence de mutation dans les gènes responsables de l'ABD (cf paragraphe génétique) • Histoire familiale positive • Anomalies congénitales décrites au cours de l'ABD • ADAe élevée • HbF élevée • Absence d'éléments en faveur d'une autre insuffisance médullaire

Tableau 1 : récapitulatif des critères pour le diagnostic de l'ABD

B/ Le traitement de l'ABD

Il existe trois traitements principaux et des traitements anecdotiques mais parfois efficaces, chacun avec ses risques et ses effets secondaires. Le choix du traitement dépend de la tolérance de l'anémie, de la réponse initiale aux glucocorticoïdes, de l'existence d'un donneur potentiel et du pays de résidence du patient. Ces traitements sont [208]:

- les glucocorticoïdes
- les transfusions sanguines associées à un chélateur de fer
- la greffe de moelle osseuse allogénique

- **Les glucocorticoïdes**

Les glucocorticoïdes font partie de la famille des corticostéroïdes qui sont des hormones naturelles synthétisées à partir du cholestérol par les glandes surrénales. Plusieurs rôles leur sont attribués. Cependant, ils sont surtout réputés comme faisant partie des anti-inflammatoires parmi les plus puissants connus.

Environ 80% des patients répondent à ce traitement, mais seulement 40% restent répondeurs sur le long terme [221]. L'élévation de l'hémoglobine est visible entre deux et quatre semaines après l'administration des glucocorticoïdes [208]. Le mécanisme d'action des glucocorticoïdes dans l'ABD est mal compris. Plusieurs études ont montré une apoptose importante des progéniteurs érythroïdes au cours de l'ABD due à une activation de la p53 [209-213]. Les glucocorticoïdes pourraient favoriser la survie cellulaire. Les glucocorticoïdes (GC) augmentent la sensibilité des érythroblastes à l'érythropoïétine (EPO) [214] : la fixation des GC à l'EPOR favorise son rapprochement avec cKit, permettant une synergie pour induire une augmentation de la prolifération et de la survie des progéniteurs érythroïdes aux stades BFU-E et CFU-E [215]. Quand la dimérisation du récepteur aux glucocorticoïdes est inhibée chez la souris, il n'y a plus d'érythropoïèse de stress en cas d'anémie hémolytique, ce qui souligne le rôle régulateur des GC sur l'érythropoïèse de stress [216]. D'autre part, la dexaméthasone, un GC de synthèse ayant des propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives, induit la dégradation de la p53 par le protéasome [217]. De plus, il a été montré qu'un traitement aux glucocorticoïdes (prednisolone et dexaméthasone) corrige l'anémie chez les souris invalidées pour *RPS19* comme chez les patients atteints d'ABD. La prolifération des BFU-E et CFU-E chez ces souris est favorisée par le traitement et la différenciation érythroïde est restaurée. La transcription des gènes activés par la p53 est réduite après le traitement à la dexaméthasone [218]. Enfin, une étude récente montre dans des cellules issues de moelle osseuse de patients atteints d'ABD que le nombre de BFU-E et de CFU-E est réduit chez les patients transfusés mais pas chez les patients traités avec des corticostéroïdes qui permettent d'augmenter le nombre de BFU-E [219]. En cas de fixation des GC à leur récepteur, il se dimérise et est transloqué au noyau où il va réguler la transcription de certains gènes qui possèdent une séquence d'ADN spécifique appelée «glucocorticoïd receptor responsive element» (GRE) [220]. Comme par exemple le gène *Zfp3612* important pour l'auto-renouvellement des progéniteurs BFU-E [221] ou le gène *Myb* important pour la prolifération des érythroblastes [215]. L'action des glucocorticoïdes passe par la voie NF-KB et favorise une réaction anti-inflammatoire [222]. Cependant, environ 20% des patients traités avec les GC ont d'importants effets secondaires sur le long terme. Ces effets secondaires peuvent être des fractures osseuses, de l'hypertension, une cataracte, un diabète et un retard de croissance [208].

- **La transfusion sanguine**

Pendant la première année de la vie et pour les patients réfractaires au traitement par les corticoïdes ou bons répondeurs mais à des doses trop élevées, supérieures à 0.5mg/kg/J, faisant courir un risque majeur de complications thérapeutiques, les transfusions de sang régulières associées à un traitement chélateur de fer (déférasirox, déféroxamine, déféripone) restent l'option thérapeutique préconisée.

- **La greffe de moelle osseuse**

Seule la greffe de moelle osseuse allogénique, de cellules souches périphériques ou de sang de cordon HLA-identiques intra-familial est actuellement curatrice. Elle est préconisée dès lors qu'il existe un donneur HLA identique avec un phénotype non-silencieux dans la famille et doit être pratiquée idéalement avant 9 ans [223].

D'autres traitements ont été testés avec des efficacités variables. Le métoclopramide, un inducteur de prolactine a montré une certaine efficacité [224-226]. En revanche, un essai clinique randomisé et en aveugle chez trente patients atteints d'ABD et transfusion-dépendants n'a montré qu'une efficacité partielle du métoclopramide (10% de réponse partielle entraînant un espacement du délai transfusionnel) [227]. D'autres traitements ont également été utilisés, mais ont montré une efficacité variable d'un patient à un autre. C'est le cas de l'interleukine-3 (IL3) [228], de la cyclosporine [229], de l'acide valproïque [230], du rituximab [231] et de la leucine [232-234]. Des approches génétiques avec des transgènes de RPS19 sauvage ont également été explorées avec succès chez des souris invalidées ou des cellules de patients mutés pour le gène *RPS19* [235-237].

C/ L'évolution clinique de l'ABD

L'évolution clinique de l'ABD est imprévisible. Les complications qui ont pu être observées sont liées soit à la maladie soit aux effets secondaires des traitements. On compte parmi les complications rares des pathologies malignes hématologiques (leucémie aiguë myéloïde et lymphoblastique, lymphome, myélodysplasie), des aplasies médullaires (arrêt de production par la moelle osseuse des différentes lignées sanguines) [210]. Les enfants atteints d'ABD ont plus de risques de développer des leucémies ou des tumeurs solides (foie et os avec une fréquence non négligeable d'ostéosarcomes) [210][221]. Cependant le risque général de malignité est moins élevé que pour d'autres insuffisances médullaires [238]. Les grossesses chez des femmes atteintes d'ABD sont à risques. 66% des grossesses ont des complications graves de type pré-éclampsie, retard de croissance du fœtus, prématurité,

fausses couches à répétition, mort fœtale... Seulement la moitié des grossesses aboutissent à une naissance. Elles doivent être encadrées dans des maternités de niveau 3 minimum avec un suivi rapproché multidisciplinaire [239].

D/ Caractéristiques génétiques de l'ABD

L'ABD fut la première ribosomopathie décrite. Des mutations dans des gènes codants pour des protéines ribosomiques (RPs) appartenant à la grande sous-unité (RPL) ou à la petite sous-unité du ribosome (RPS) sont à l'origine de la maladie dans 70% des cas.

Le premier gène découvert fut *RPS19* en 1999 en étudiant un caryotype anormal avec une translocation équilibrée entre les chromosomes X et 19 chez une patiente suédoise [240]. Ce gène est impliqué dans 25% des cas d'ABD de l'ensemble des registres internationaux. Par la suite, d'autres gènes codants pour des protéines ribosomiques ont été identifiés chez les patients. Il s'agit des gènes *RPS24* (2,4% des cas), *RPL5* (6,6%), *RPS10* (2,6%), *RPS26* (6,4%), *RPL35a* (3%), *RPL11* (4,8%), *RPS17* (< 1%), *RPS15* (< 1%), *RPS27* (<1%), *RPS28* (<1%), *RPS29* (<1%), *RPS7* (<1%), *RPL9* (<1%), *RPL36* (<1%), *RPL31* (<1%) [210]. Dans 20% des cas, il existe une grande délétion dans un des gènes connus et impliqués dans l'ABD [241]. Au total, une anomalie génétique serait maintenant identifiable chez un peu plus de 70% des patients. Les mutations détectées sont toujours hétérozygotes, on suppose que l'homozygotie est létale. Les mutations sont de tout type : faux sens, non-sens, délétionnelles, insertionnelles ou dues à une anomalie d'épissage. Une étude menée sur 25 patients séquencés pour l'ensemble des gènes de protéines ribosomiques a mis en évidence qu'il n'y a qu'une seule mutation par patient [242].

Les mutations des gènes de RPs entraînent des défauts de maturation des ARN ribosomiques (ARNr) dont le niveau d'atteinte dans la chronologie de la maturation des ARNr dépend du gène muté [244]. Bien qu'il n'existe pas de corrélation phénotype/génotype pour les mutations du gène *RPS19*, les fréquences de certaines malformations sont plus importantes pour des mutations dans certains gènes de RPs. Par exemple, les mutations du gène *RPL5* sont plus souvent associées à des malformations ORL (fente palatine...) et des malformations cardiaques et craniofaciales. C'est chez les patients mutés pour le gène *RPL5* qu'il existe le plus grand nombre de malformations. Les mutations du gène *RPL11* sont souvent, mais de façon non-exclusive, associées à la malformation rare du pouce triphalangé [243] [245-246]. L'apparition de la maladie est sporadique (55% des cas) et dans les formes familiales (45%), la transmission est autosomale dominante. Récemment, trois nouveaux

gènes ont été retrouvés mutés dans l'ABD. Il s'agit du gène *TSR2*, qui code pour un pré-ARNr nécessaire à la maturation du pré-ARNr 20S, du gène *RPS28* [247], et du gène *GATA-1* avec 5 familles décrites dans le monde actuellement avec des mutations de l'ATG ou du site donneur d'épissage de l'exon 2 [248-251]. Toutes les mutations observées du gène *GATA-1* aboutissent à l'absence d'expression de la forme longue de GATA-1. La forme courte de GATA-1 n'est pas fonctionnelle car elle n'a pas le domaine N-terminal de transactivation essentiel à l'activité transcriptionnelle de GATA-1 [249]. Les mutations *GATA-1* et *TSR2* ont une transmission génétique liée au chromosome X [210].

E/ Mécanismes physiopathologiques de l'ABD

E.1/ Modèles animaux permettant l'étude de l'ABD (Figure 22)

Les résultats obtenus grâce aux modèles animaux se sont avérés utiles pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie.

- **La drosophile « syndrome minute »**

L'exemple de la mouche « syndrome minute » est intéressant pour illustrer la variation du phénotype dans l'ABD en lien avec l'haplo-suffisance en protéine ribosomique fonctionnelle. Chez *Drosophila Melanogaster*, des mutations dans les gènes de protéines ribosomiques induisent le « syndrome minute » caractérisé par des anomalies du développement et de croissance, une infertilité, une macrophtalmie, des anomalies des ailes, des cuticules et des segmentations abdominales [252-253]. Comme chez l'Homme, l'homozygotie de la mutation est supposée létale. Un « syndrome minute-like » pour RPS19 a été reproduit grâce à l'insertion d'un élément P dans la région promotrice du gène [254]. Plus le niveau d'ARNm de RPS19 est bas, plus les anomalies sont prononcées confirmant le mécanisme d'haplo-insuffisance comme mécanisme principal impliqué au cours de l'ABD. Le phénotype est ainsi directement influencé par la quantité de protéine RPS19 fonctionnelle disponible. Chez l'Homme, l'équipe d'Hana Gazda [255] a montré que chez des patients mutés pour RPS19, le ratio entre l'ARNm issu de l'allèle muté et celui issu de l'allèle non-muté était de 1:1. Des facteurs épigénétiques pourraient expliquer les évolutions de la maladie au cours du temps. Il existe également des patients porteurs de mutations avec des phénotypes silencieux, qui n'expriment que discrètement certains signes de la maladie [220].

- **Les modèles murins**

L'inactivation homozygote du gène *rps19* chez la souris entraîne une létalité *in utero* [256] tandis qu'à l'état hétérozygote l'inactivation du gène ne conduit à aucune anomalie de

l'érythroïèse. Cependant ces souris hétérozygotes n'ont pas de diminution de RPS19. L'équipe de D. Bodine (NIH, Bethesda, USA) en collaboration avec notre équipe a créé un modèle de souris transgénique Cre/Lox, portant la mutation p.Arg62Trp de RPS19 fréquemment identifiée au cours de l'ABD. Ce modèle reproduit le phénotype de l'ABD *in vivo* (retard de croissance, anémie) et *in vitro* (diminution du nombre de BFU-E et de CFU-E) [257]. Les souris Dark Skin Dsk3^{+/-} porteuses d'une mutation ponctuelle du gène *rps19* ont un retard de croissance, une anémie, et une augmentation de l'apoptose due à une activation de la p53 [258]. Le même phénotype a été observé par cette équipe chez des souris Dsk4^{+/-} ayant une mutation ponctuelle dans le gène *RPS20* [258]. D'autres mutations ont été étudiées chez la souris. Deux souris ayant des mutations hétérozygotes du gène *rps7* ont été décrites. Ces souris ont une taille réduite, des malformations du squelette, des yeux, mais aussi du système nerveux central. Elles n'ont cependant pas d'anémie [259]. Une souris ayant une mutation hétérozygote inducible par le système *cre/lox* pour le gène *rpl11* a aussi été décrite [260]. Les souris *rpl11*^{lox/lox} meurent. La souris *rpl11*^{+/lox} développe une anémie : le nombre de BFU-E est réduit et les précurseurs ont une différenciation retardée malgré un taux d'EPO très élevé indiquant la tentative de mise en place d'un mécanisme compensateur. Les transcrits d'ARNm de l'ALAS2 et des globines sont très réduits. La p53 est activée et il y a une activation transcriptionnelle du gène proto-oncogène *c-Myc* : plusieurs souris ont développé des cancers. D'autre part, Sieff et al. ont montré dans une culture primaire de cellules érythroïdes de foie foetal de souris qu'une inhibition de l'expression de *rps19* grâce à un ARN interférent aboutit à une inhibition de la protéine c-MYB, le facteur de transcription du récepteur c-Kit dont l'expression transcriptionnelle et protéique est réduite. D'autre part, ces cellules ont une activation de la p53 confirmée par l'augmentation transcriptionnelle d'une de ses cibles, le gène *p21*. Enfin, la prolifération des cellules est réduite mais elles n'ont pas de retard de différenciation érythroïde [261]. Ces données chez la souris récapitulent bien certains mécanismes physiopathologiques observés chez l'Homme. D'autre part, elles soulignent l'influence de chaque mutation sur la variabilité du phénotype observé, et la nécessité d'étudier chaque mutation de gène de RP séparément. Bien que les modèles murins permettent de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie, ils ne sont pas directement superposables à l'Homme. En effet, il existe de nombreuses différences entre l'érythroïèse murine et l'érythroïèse humaine du point de vue génétique mais aussi fonctionnel comme par exemple la durée de vie moyenne des érythrocytes dans la circulation sanguine qui est de 120 jours chez l'Homme et de 42 jours chez la souris [262].

- **Le modèle poisson zèbre**

Chez le poisson zèbre, l'inhibition du gène *rps19* dans un modèle morpholino induit une petite taille, ainsi qu'une diminution du nombre de globules rouges, du taux d'hémoglobine et un retard de différenciation des progéniteurs érythroïdes [263-264]. Des études ont également été réalisées chez le poisson zèbre pour la protéine RPL11 dont l'inhibition conduit à des anomalies du système nerveux qui sont létales vers J6-J7 post-fertilisation ainsi qu'un défaut de développement des CSHs [265]. Une diminution de l'expression de certains gènes impliqués dans la biosynthèse de l'hème (*ALAS2*), de la biosynthèse du cholestérol et des acides gras a également été observée. L'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des purines (*ADA*) (également observée chez les patients ABD), dans le catabolisme de la vitamine D (*cyp24a1*), et dans le métabolisme de la gluconéogenèse et de l'insuline est augmentée. L'inhibition du gène *rps7* chez le poisson zèbre induit aussi des défauts morphologiques qui ont été décrits chez les patients (petite taille, malformation de la tête, et du cœur), ainsi qu'une altération de la différenciation érythroïde responsable d'une anémie (diminution de l'expression transcriptionnelle de GATA-1 et de la globine α) et une activation de la voie de p53 (augmentation de l'expression transcriptionnelle de p53, MDM2, Bax, Puma) [266]. Le sauvetage de RPS7 et l'inhibition de p53 permettent d'abolir en partie les anomalies morphologiques et le défaut de l'érythropoïèse (augmentation du taux d'hémoglobine, de l'expression de GATA-1, et de la globine α).

- **Le modèle du chat atteint par le FLVc**

L'équipe de Janis Abkowitz aux Etats-Unis a décrit un modèle de chat atteint par le Feline Leukemia Virus de type c (FLVc) qui présente une anémie sévère avec un taux d'hématocrite entre 4 et 15% [267] secondaire à un blocage entre les stades BFU-E et CFU-E. Les CFU-E sont sévèrement déplétées dans ce modèle. Les taux de granulocytes et de plaquettes sont normaux. Dans le modèle félin infecté par le FLVc, le virus se fixe sur son récepteur FLVCR1. FLVCR1 devient inactif et ne peut plus exporter l'hème intracellulaire. Les résultats obtenus dans ce modèle suggèrent que FLVCR1 joue un rôle très important au cours de l'érythropoïèse. Sur la base de ces résultats, la même équipe a développé des souris avec des mutations hétérozygotes constitutives ou inductibles pour FLVCR1 [170]. À partir d'E14.5, des malformations que l'on retrouve dans le tableau clinique de l'ABD étaient reconnaissables chez les souris mutées pour FLVCR1 : un hypertélorisme, un retard de croissance, des malformations au niveau des extrémités, des faces aplaties. Les souris invalidées de façon homozygote pour FLVCR1 meurent *in utero*. Le taux d'ARNm de

FLVCR1 chez les souris est diminué, mais la protéine reste exprimée à des taux semblables à ceux des contrôles. Les souris sont pâles et développent une anémie macrocytaire. Les analyses en cytométrie de flux indiquent un arrêt de maturation érythroïde vers le stade proérythroblaste. Les cultures de progéniteurs sur méthylcellulose montrent que le nombre de BFU-E obtenu par rapport aux contrôles est plus faible tandis qu'aucune colonie de CFU-E n'a été obtenue pour les souris mutées. D'autre part, cette équipe a montré que FLVCR1 est un exporteur d'hème macrophagique. Les auteurs font l'hypothèse que FLVCR1 est nécessaire durant l'érythropoïèse pour maintenir un taux d'hème peu élevé et éviter une concentration d'hème libre trop forte dans les érythroblastes et en particulier entre les stades CFU-E et proérythroblaste. L'apoptose observée serait due à une trop forte concentration d'hème libre dans les cellules.

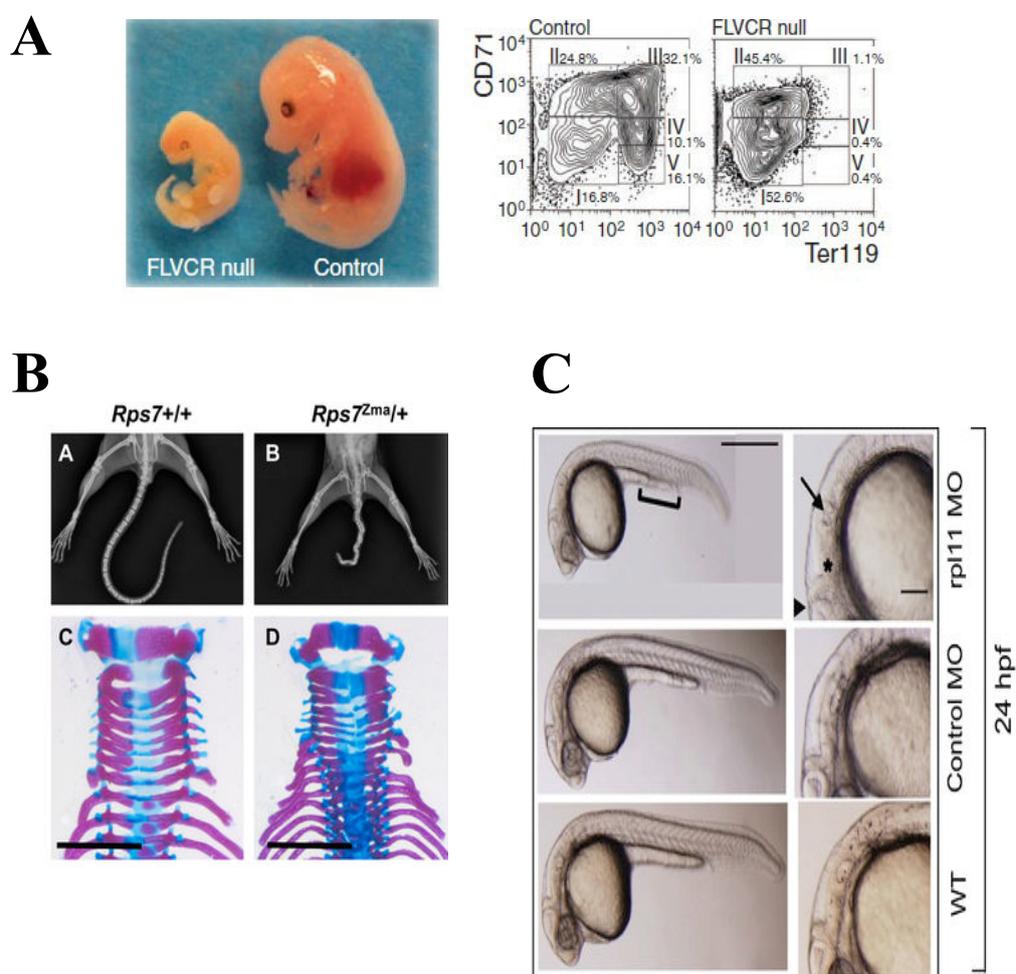


Figure 22. Illustrations de modèles animaux pour l'ABD. A/ Panneau 1 (à gauche) : la souris invalidée de façon homogygote pour FLVCR1a (à gauche) montre une taille réduite et un défaut d'hémoglobinisation par rapport à la souris contrôle (à droite). Panneau 2 (à droite) : la différenciation des érythroblastes est retardée (36% de plus de cellules en stade I CD71⁺ et Ter119⁺ (Ter119 est un marqueur protéique des globules rouges) chez la souris invalidée pour FLVCR1 par rapport à la souris contrôle (images Keel et al. [170])). B/ Radiographies de souris contrôles (à gauche) et de souris ayant des mutations hétérozygotes dans le gène *rpl7*

(à droite) (a et b membres postérieurs, c et d moelle épinière). Les souris mutées pour RPL7 ont des malformations du squelette comparées au contrôle (image Watkins-Chow et al. [259]) ; C/ Poisson zèbre sauvage (WT), après injection de morpholinos permettant d'inhiber le gène *rp111* (RPL11 MO) ou un morpholino contrôle (control MO). Les morphants RPL11 MO sont plus petits, l'extension du sac vitellin est incomplète et ils ont des malformations de l'encéphale (flèche et astérisque) (image Chakraborty et al. [259]).

E.2/ Etude de l'ABD chez l'Homme

Nous commençons à comprendre quelques-uns des mécanismes physiopathologiques de l'ABD chez l'Homme. Un défaut de prolifération et de différenciation des progéniteurs vers les stades BFU-E et CFU-E a été décrit [269-272]. L'infection de cellules CD34⁺ de patients mutés pour *RPS19* avec un onco-rétrovirus [272] exprimant l'ADNc de *RPS19* sauvage permet de tripler le nombre de colonies BFU-E et CFU-E obtenues après culture sur méthylcellulose. Le stade précis du blocage érythroïde observé est encore discuté. Un système de culture en deux phases a montré qu'il se situerait entre le stade EPO-indépendant BFU-E et le stade EPO-dépendant CFU-E [269]. Des cultures à long-terme de type « long term culture-initiating cell » (LTC-IC) ont mis en évidence un défaut de la prolifération et de différenciation des lignées érythroïde/mégacaryocytaire et/ou monocytaire-granulocytaire suggérant un défaut intrinsèque qui se mettrait en place au niveau du progéniteur commun de ces lignées le CFU-GEMM [273-275]. Ces résultats expérimentaux pourraient expliquer la thrombopénie et/ou la neutropénie que l'on observe parfois au moment du diagnostic dans l'ABD mais qui sont rares ou pourraient expliquer l'évolution rarissime vers l'aplasie médullaire. D'autre part, des expériences utilisant des stromas de patients d'ABD et des CD34⁺ témoins ont permis d'écarter l'hypothèse selon laquelle l'ABD pourrait être liée à une anomalie du micro-environnement érythropoïétique [275-276]. Les résultats favorables des greffes de moelle osseuse chez les patients semblent renforcer ces arguments, mais des études plus récentes seraient nécessaires afin d'écarter toute implication du stroma dans la physiopathologie de l'ABD.

Plusieurs études ont montré que l'ajout de SCF dans les cultures de cellules de patients permettait d'augmenter le nombre de BFU-E ainsi que leur taille [277-279]. Cependant, au stade CFU-E les cellules reprennent un retard de différenciation suggérant une possible insensibilité à l'EPO [269]. Cette conclusion avait déjà été faite en 1989 par Halperin and Freedman [280-281] qui avaient remarqué que les progéniteurs érythroïdes de patients ABD étaient réfractaires à l'EPO. On sait aujourd'hui qu'il ne s'agit pas d'un problème de synthèse d'EPO car la concentration plasmatique d'EPO est augmentée chez les patients atteints d'ABD [282-283]. Au-delà du fait que le blocage de la maturation érythroïde entraîne

un nombre de progéniteurs réduit pouvant répondre à l'EPO, on ne peut pas écarter l'hypothèse que ces cellules soient intrinsèquement moins sensibles à l'EPO. D'autant plus, que la greffe de moelle osseuse allogénique est curative [284]. A ce jour, aucune mutation du récepteur de l'EPO ou de l'EPO n'a été mise en évidence chez les patients [285]. Récemment, une étude a montré une dérégulation de la voie du TGF β (Transforming Growth Factor β) dans des cellules iPSC (induced pluripotent stem cells) induites à partir de fibroblastes de patients ABD porteurs de mutations dans les gènes *RPS19* et *RPL5* [286]. Le TGF β est un inhibiteur de la prolifération des cellules souches *via* SMAD4 [287]. Les auteurs ont mis en évidence une activation de la voie non-canonique au TGF β (voie p-JNK) qui aurait pour conséquence une inhibition de l'hématopoïèse [286].

Une augmentation de l'apoptose dans des cellules CD34⁺ issues de moelle osseuse de patients atteints d'ABD a été mise en évidence [288] et aussi dans des lignées cellulaires UT7 et TF1 après infection par des lentivirus inhibant l'expression de *RPS19* [288][212] et *RPL35a* [289]. Notre équipe a mis en évidence deux phénotypes distincts au cours de l'ABD *in vitro* chez les patients et dans notre modèle d'ARNs interférents inhibant *RPS19* ou *RPL11* dans des cellules CD34⁺ issues de sang de cordon [213]. Nous avons décrit un défaut de prolifération en cas d'haplo-insuffisance en *RPS19* avec une légère apoptose et sans altération de la différenciation érythroïde et au contraire, une apoptose importante avec retard de différenciation et une diminution drastique de la prolifération érythroïde en cas d'haplo-insuffisance de *RPL11* [213]. Dans les deux phénotypes, un arrêt du cycle cellulaire en phase G₀/G₁ du cycle cellulaire est noté. Le défaut de prolifération lié à l'apoptose des progéniteurs érythroïdes ainsi que le blocage du cycle cellulaire observés sont dûs à une activation de la p53 et une augmentation transcriptionnelle de ses cibles (Bax, Noxa, p21). La transduction d'un shp53 dans ces cellules permet d'augmenter la prolifération cellulaire et de restaurer l'expression de la protéine *RPL11*. L'équipe du Dr Ebert a montré dans des cellules CD34⁺ humaines issues de moelle osseuse que cette activation de la p53 au cours de l'ABD est spécifique à la lignée érythroïde car p53 n'est pas surexprimée dans les lignées myéloïdes ou mégacaryocytaires [212]. Cette équipe a également montré que l'inactivation de la p53 avec un inhibiteur (la pifithrine α) permet d'assurer la survie cellulaire et d'augmenter la prolifération [212]. Bien que l'apoptose p53-dépendante ait été très largement décrite dans la littérature [218][290-292], plusieurs études viennent nuancer le rôle de p53 dans l'anémie de Blackfan-Diamond car des mécanismes p53-indépendants ont été décrits dans des modèles animaux souris et poisson zèbre [293-296]. D'autre part, une étude a aussi mis en évidence de l'autophagie dans des cellules CD34⁺ de patients mutés pour les gènes *RPS17*, *RPL11* et *RPS7* et des cellules CD34⁺ issues de sang de cordon transduites avec un sh*RPS19* [297].

L'inhibition de *RPS19* dans ces modèles aboutit à une hyperphosphorylation de la S6 kinase et une augmentation de production de FRO. L'hyperphosphorylation de la S6 kinase inhibe la voie AKT et induit une activation de la p53. Un traitement antioxydant réduit la phosphorylation de la S6 kinase, l'autophagie et stabilise la p53. Les auteurs postulent que l'inhibition des protéines ribosomiques (RPs) active la S6 kinase et p53 du fait d'une augmentation de production de FRO [297].

III/ L'anémie de Blackfan-Diamond : une maladie du ribosome

A/ Phylogénie du ribosome

Le ribosome est un assemblage nucléoprotéique dont la fonction principale est d'assurer la synthèse protéique. Une des particularités moléculaires des ARN ribosomiques (ARNr) est d'avoir des séquences très conservées à travers les âges. C'est sur la comparaison de la séquence des ARNr 16S que la phylogénie moléculaire a permis de classer les êtres vivants en trois clades ou trois lignées phylogénétiques : les eucaryotes dont nous faisons partie, les eubactéries et les archéobactéries que l'on regroupe sous le terme de procaryotes. Chez les procaryotes, l'ARNr 16S constitue la petite sous-unité du ribosome alors que chez les eucaryotes l'ARNr 16S est mitochondrial et la petite sous-unité du ribosome est constituée par l'ARNr 18S. Il existe aujourd'hui une banque de données de plusieurs millions de séquences d'ARNr 16S et 18S appelées séquences « empreintes » ou « codes-barres » car elles permettent de classer instantanément l'organisme étudié dans l'arbre phylogénétique.

B/ La biogenèse des ribosomes chez les eucaryotes

Le ribosome eucaryote est constitué de deux sous-unités : une petite sous-unité 40S composée de 32 protéines ribosomiques (RPS) et d'un seul ARNr (ARNr 18S) et une grande sous-unité 60S composée de 47 protéines ribosomiques (RPL) et de trois ARNr (5S, 5,8S et 28S). L'assemblage du ribosome est un processus complexe qui a lieu séquentiellement au sein du nucléole, du nucléoplasme et du cytoplasme [347]. Il nécessite des interactions coordonnées dans le temps et dans l'espace entre les protéines ribosomiques (RPs), les ARNr et près de deux cent cofacteurs protéiques dont certains interagissent avec les RPs et les ARNr comme les small nucleolar ribonucleoprotein ou petites ribonucléoprotéines nucléolaires (snoRNP).

- **Les ARNr**

Plusieurs ARN sont nécessaires pour la constitution d'un ribosome mature. Ils sont tous synthétisés dans le noyau à partir de l'ADN (**Figure 23**). On peut les séparer en trois types : les ARN synthétisés dans le nucléole à partir d'un précurseur commun qui sont les ARNr 18S, 5,8S et 28S ; l'ARN 5S synthétisé dans le nucléoplasme et enfin les snoARN qui formeront les snoRNP eux aussi synthétisés dans le nucléoplasme.

Les ARNr terminaux 18S, 5,8S et 28S sont issus de la maturation d'un ARNr précurseur appelé pré-ARNr 47S qui est transcrit dans le nucléole par l'ARN polymérase I (**Figure 23**). L'ARNr 5S est transcrit par l'ARN polymérase III dans le nucléoplasme. Après maturation, le pré-ARNr 47S s'assemble à l'ARNr 5S et aux protéines de la petite (RPS) et de la grande sous-unité (RPL) dans le nucléole pour former une grosse structure nucléoprotéique appelée pré-ARNr 90S (**Figure 22**). Ce complexe est également associé à des co-facteurs, les snoRNP qui sont responsables de deux principales modifications enzymatiques sur les pré-ARNr pour leur maturation : la pseudouridylation et la méthylation. Le nombre total de snoRNP serait de 50 à 100 mais la plupart d'entre elles n'ont pas été caractérisées et seul les rôles d'un petit nombre d'entre elles sont bien connus.

Le pré-ARNr 90S subit plusieurs étapes de clivage par les snoRNP qui éliminent successivement des séquences transcrites intercalaires externes (ETS) en 5' puis en 3' du pré-ARNr et des séquences intercalaires interne (ITS) [298]. Le clivage du pré-ARNr 90S dans l'ITS1, va aboutir à la formation des particules pré-40S et pré-60S. Ces deux particules vont ensuite suivre des voies de maturation indépendantes qui aboutissent après le clivage de l'extrémité 3' de la pré-40S et le clivage de l'extrémité 5' et de l'ITS2 de la pré-60S à la formation des ARNr 18S à partir de la particule pré-40S et des ARNr 5,8S et 28S à partir de la particule pré-60S.

- les RPs et l'assemblage des pré-ribosomes

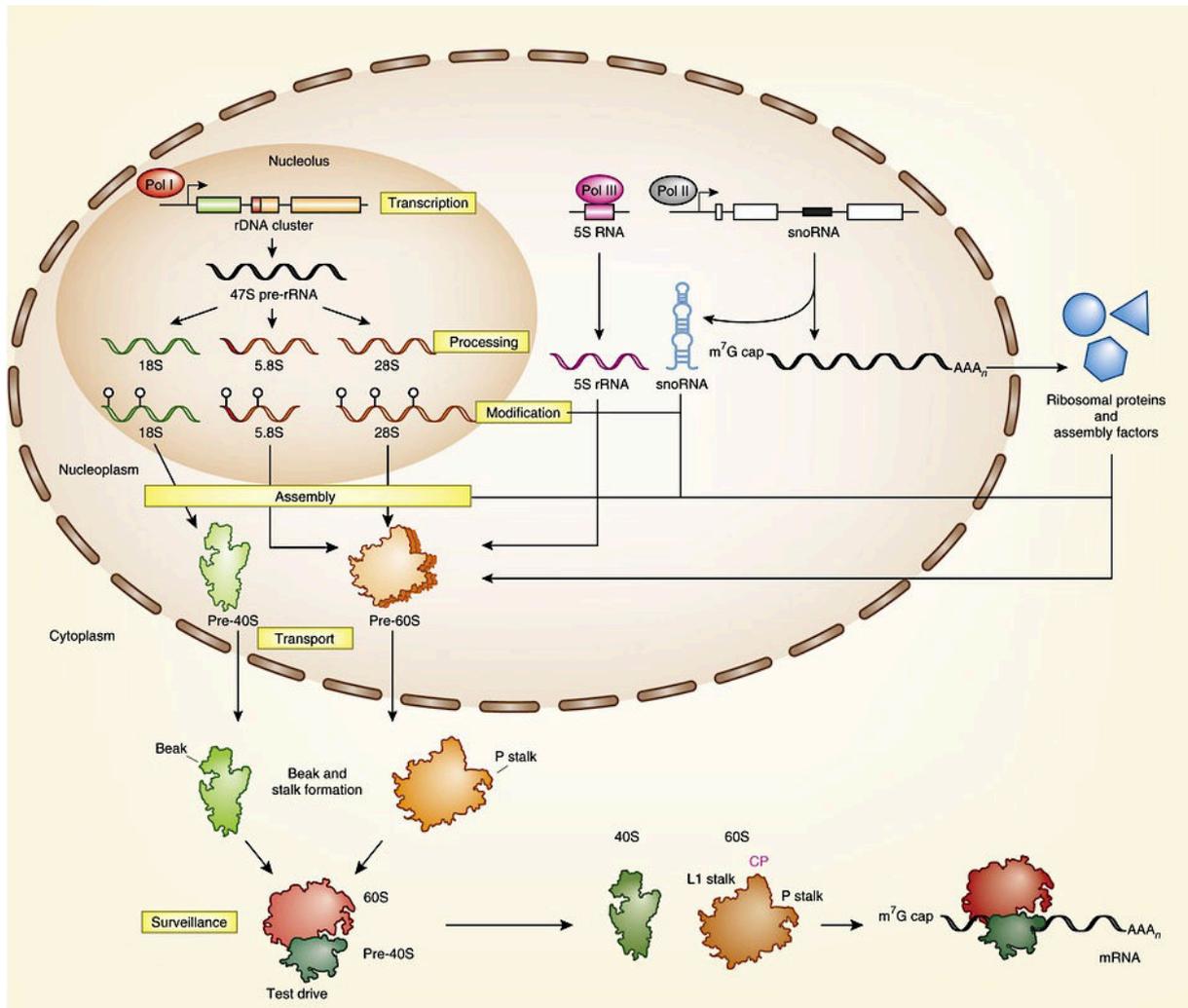


Figure 23. Schéma de la synthèse du ribosome eucaryote (image DLJ Lafontaine, Nature Structural & Molecular Biology [299]). Les RPs sont synthétisées dans le cytoplasme et importées dans le nucléole où elles sont dégradées par le protéasome ou assemblées au sein des sous-unités 40S et 60S en formation avec les ARNr. Les pré-particules des sous-unités ribosomiques sont exportées dans le cytoplasme pour former les ribosomes matures fonctionnels où ils serviront à la synthèse protéique.

Les RPs sont synthétisées dans le cytoplasme et transportées dans le noyau à travers les pores nucléaires grâce à leur séquence NLS (Nuclear Localization Signal) et plusieurs protéines telles que l'importine β , l'importine $\beta 3$, la transportine, RanB5 et RanB7. Les RPs sont transportées dans le nucléole probablement grâce à la nucléoline où elles vont être assemblées à l'ARNr pour former les particules pré-ribosomiques. La maturation du ribosome s'achève par l'export par des pores nucléaires différents des particules pré-ribosomiques du noyau vers le cytoplasme où elles deviendront la petite sous-unité (40S) et la grande sous-unité (60S) du ribosome capables d'assurer leur fonction principale : la synthèse protéique.

C/ La synthèse protéique chez les eucaryotes

La synthèse des protéines à partir des ARNm chez les eucaryotes a lieu dans le cytoplasme des cellules dans les ribosomes. Ces derniers peuvent être associés à l'enveloppe nucléaire, à la membrane du réticulum endoplasmique, mitochondriaux ou libres. Cette synthèse peut être décrite en trois grandes étapes (initiation, élongation, terminaison) qui sont complexes et dont plusieurs mécanismes sont encore inconnus. Elles font intervenir un nombre important d'acteurs cellulaires comme les ARNr, les ARNm, les ARNt, les facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison, les enzymes et leurs cofacteurs.

- **Les différentes étapes de la synthèse protéique**

Chaque ribosome est constitué de deux sous-unités, la petite sous-unité (40S) formée d'ARNr et de protéines ribosomiques de la petite sous-unité (RPS) et la grande sous-unité (60S) formée des ARNr et protéines ribosomiques de la grande sous-unité (RPL). La petite sous-unité fixe l'ARNm et la grande sous-unité fixe les ARNt, recrute les acides aminés correspondant au codon de l'ARNm lu et permet l'élongation et la sortie de la chaîne polypeptidique. Quand la traduction est terminée, les deux sous-unités se dissocient. Plusieurs ribosomes peuvent être associés à un même ARNm et chacun de ces ribosomes synthétise une chaîne polypeptidique.

- **Phase d'initiation (Figure 24) [300]**

Le facteur d'initiation EIF2 forme un complexe ternaire avec un GTP et l'ARNt d'initiation porteur de la méthionine initiatrice ($\text{Met-ARNt}^{\text{met}}_i$) de chaque traduction. Les facteurs EIF1, EIF1A et EIF3 vont faciliter la liaison du complexe EIF-2-GTP- $\text{Met-ARNt}^{\text{met}}_i$ à la petite sous-unité ribosomique 40S formant ainsi le complexe 43S. Parallèlement, le complexe EIF-4F réarrange la conformation de l'ARNm en une boucle grâce à son activité d'hélicase ARN-ATPase dépendante. Il lie les parties 5' et 3' de l'ARNm. Cette liaison est accomplie grâce à l'action coordonnée des facteurs EIF4A dépendante de l'ATP, des protéines liants l'ARN, EIF4B, EIF4F, EIF4G, du facteur EIF3 et de la protéine PABP (poly(A) binding protein) liée à la queue poly(A) à l'extrémité 3' de l'ARNm. Ces modifications vont permettre l'assemblage de l'ARNm avec le complexe 43S. Le complexe 43S déchiffre l'ARNm auquel il est lié dans le sens 5' vers 3' à la recherche du codon d'initiation AUG facilitée par la reconnaissance d'une séquence Kozac en amont du codon d'initiation GCCRCC/AUG où R est une purine A ou G et par les facteurs EIF-1 et EIF-1A qui permettent au complexe de pré-initiation 43S d'atteindre le codon d'initiation AUG. Lorsque qu'il y a reconnaissance du codon d'initiation, il y a un appariement de celui-ci avec

l'anticodon porté par le complexe EIF-2-GTP- Met-ARNt^{met}, ce qui aboutit au changement conformationnel du complexe 43S qui devient le complexe d'initiation 48S. Ce changement conformationnel aboutit au déplacement de EIF1 qui entraîne l'hydrolyse du GTP porté par EIF2 α en GDP par le facteur EIF5. L'hydrolyse du GTP entraîne la dissociation et le relargage du complexe EIF2-GDP de l'ARNt-Met au niveau du site P de la sous-unité 40S et la dissociation simultanée des facteurs EIF1, EIF3 et EIF5. Le complexe EIF5B-GTP et la grande sous-unité ribosomique 60S se lient au reste du complexe 48S. Finalement, l'hydrolyse du GTP de EIF5B aboutit à son relargage ainsi qu'à celui de EIF1A pour donner le complexe d'initiation 80S qui marque la fin de la phase d'initiation de la synthèse protéique et le début de la phase d'élongation.

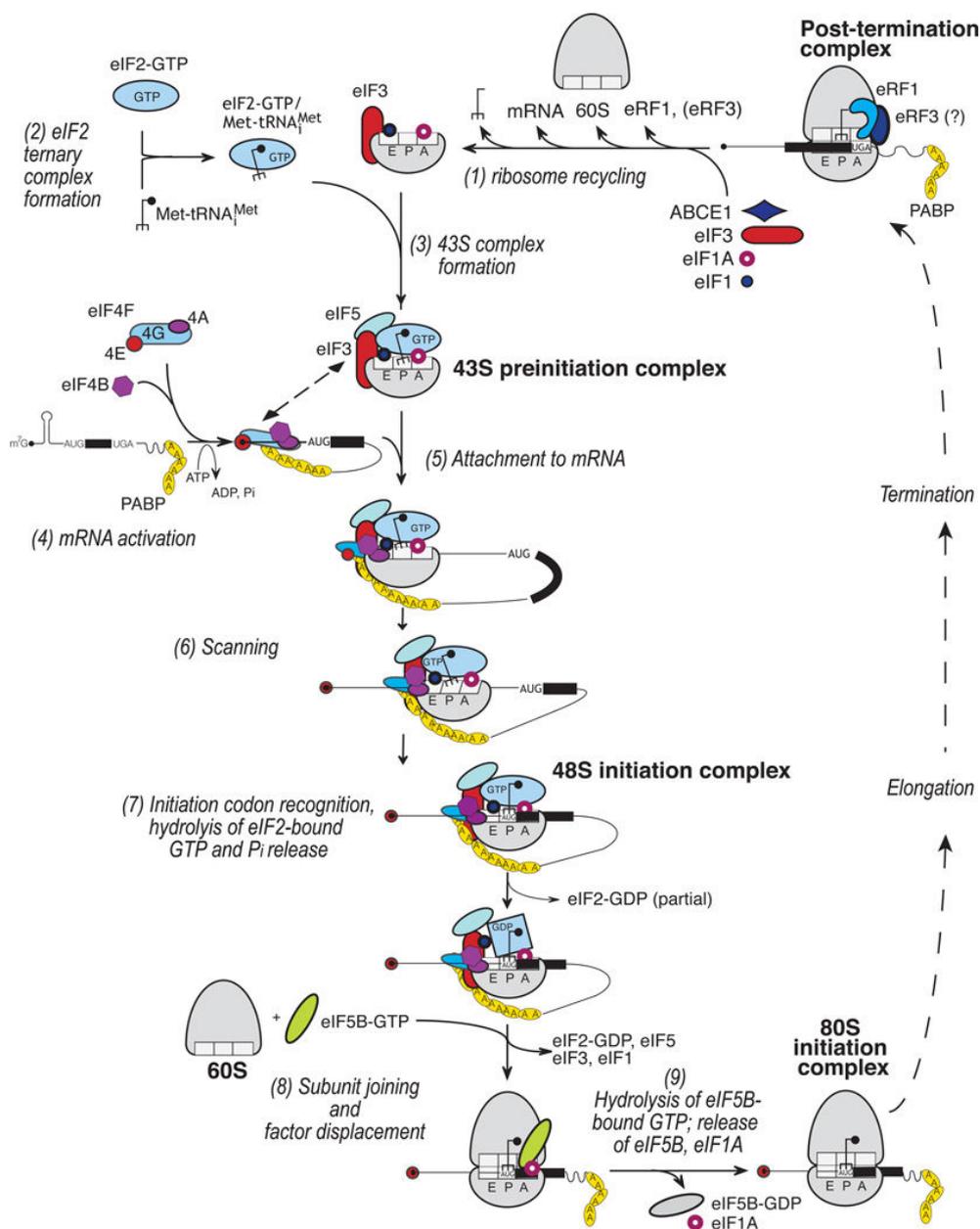


Figure 24. Les étapes d'initiation de la synthèse protéique chez les eucaryotes. Modèle canonique (image Jackson et al. [300]).

- **Phase d'élongation** [301]

Le ribosome possède trois sites : le site A (ou aminoacyl) occupé par le complexe acide aminé/ ARNt ou aminoacyl-ARNt; le site P (ou peptidyl) occupé par le complexe polypeptide/ ARNt ou peptidyl-ARNt et le site E (ou exit) occupé par l'ARNt qui part du ribosome. La phase d'élongation est une répétition en boucle de trois phases distinctes (le décodage, la formation de la liaison peptidique et la translocation) (**Figure 25**). Au début de l'élongation l'AUG est en position dans le site P. Le facteur d'élongation eEF-1A forme un complexe ternaire avec un GTP et l'aminoacyl-ARNt chargé avec l'acide aminé suivant (aa-ARNt). eEF-1A protège les liaisons esters des acides aminés de l'hydrolyse. L'acide aminé est amené au site A du ribosome pour la traduction de l'ARNm. Si la reconnaissance codon/anticodon est correcte, il va y avoir un changement conformationnel du ribosome qui va induire l'hydrolyse du GTP de eEF-1A qui va être relargué. La formation de la liaison peptidique implique une attaque nucléophile du groupement aminé de l'acide aminé lié au groupement hydroxyle en 3' de l'adénosine terminale de l'ARNt au site A sur le groupement carbonyle de l'acide aminé auquel est attaché le polypeptide naissant lié par une liaison ester à l'ARNt au site P. Simultanément, l'ARNt non-chargé de la méthionine initiatrice est décalé du site P vers le site E tandis que le peptidyl-ARNt est transloqué du site A au site P. Le processus est facilité par le facteur d'élongation EF2 et le GTP. Le ribosome se déplace au codon suivant sur l'ARNm. Le site A est de nouveau disponible pour l'interaction avec un nouveau complexe eEF-1A-GTP-aa-ARNt au site A et ainsi de suite.

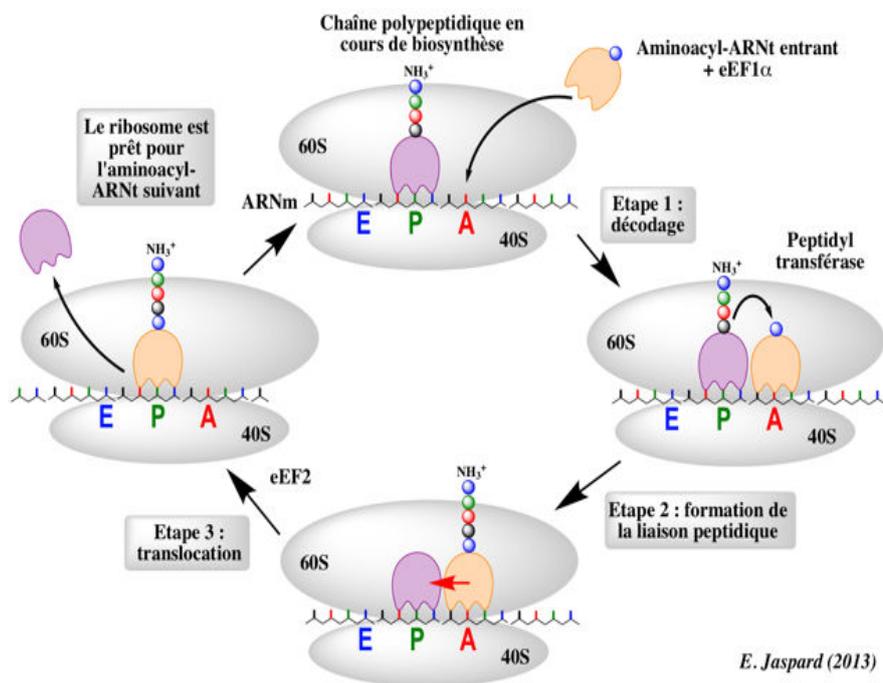


Figure 25. La phase d'élongation de la synthèse protéique chez les eucaryotes (image Jaspard [301])

- **Phase de terminaison**

L'élongation se répète en boucle jusqu'à ce que le ribosome rencontre un codon STOP (UAG, UAA ou UGA). La traduction se termine quand l'un de ces codons occupe le site A. Les codons STOP n'ont pas d'ARNt correspondants, ils sont reconnus par le facteur de relargage eRF1 (eucaryotic release factor 1). L'activité de eRF1 est stimulée par eRF3-GTP. Le complexe eRF1-eRF3-GTP se lie aux ribosomes qui ont un codon STOP au site A et catalyse la coupure de la liaison ester entre le peptide synthétisé et le peptidyl-ARNt, libérant ainsi la nouvelle protéine. Après l'hydrolyse du GTP, les facteurs de relargage sont libérés et le ribosome va soit s'assembler à nouveau soit être dégradé par autophagie dans un autophagosome.

D/ Altération de la synthèse protéique dans l'ABD

D.1/ Rôles des protéines RPS19, RPL5 et RPL11

- **RPS19**

RPS19 fait partie des trente deux RPs qui associées à l'ARNr 18S rRNA, constituent la petite sous-unité 40S du ribosome. Des données de microscopie électronique ont montré que RPS19 est localisée à la surface externe de la petite sous-unité 40S à proximité de RPS3A, RPS13, RPS16 et RPS24 dans une région qui interagit avec EIF-2 [302-303].

Différents types de mutations hétérozygotes ont été trouvées chez les patients mutés pour le gène *RPS19* : mutations faux-sens, non-sens, délétions, insertions, défaut d'épissage et des réarrangements introniques ou de l'extrémité 5'UTR. Ces mutations peuvent aboutir à une protéine RPS19 moins exprimée, qui peut perdre sa localisation nucléolaire [304].

L'étude de l'interactome de RPS19 a montré que cette protéine devait avoir plus qu'un rôle structural au sein du ribosome. Cent cinquante neuf partenaires théoriques de RPS19 ont été trouvés appartenant à différentes classes de protéines (NT-Pases, hydrolases/hélicases, isomérasés, kinases, facteurs d'épissage, constituants structurels de ribosomes, facteurs de transcription, transférases, transporteurs et protéines favorisant l'interaction ADN/ARN). RPS19 interagit également avec le pré-ribosome 90S et des protéines importantes pour le transport de la particule 40S du noyau vers le cytoplasme et des protéines impliquées dans la pseudo-uridylation des ARNr, un processus se déroulant aux premiers stades de la biogenèse du ribosome [305].

C'est grâce à l'invalidation d'un des deux gènes *RPS19* de la levure et la découverte d'une altération de la maturation des ARNr, notamment de l'ARNr 18S qu'on a pu définitivement considérée l'ABD comme une ribosomopathie [306]. L'inhibition de *RPS19 in vitro* entraîne une réduction de la maturation de la sous-unité 40S et une augmentation de l'expression de la sous-unité 60S ainsi qu'une synthèse réduite de l'ARNr 18S et une accumulation du pré-ARNr 21S [307-308]. Ces résultats ont été confirmés dans des cellules CD34⁺ de issues de moelle osseuse en différenciation érythroïde et des fibroblastes cutanés de patients [309-310] et dans des iPSC produits à partir de fibroblastes cutanés de patients mutés pour *RPS19* [311]. L'atteinte de la maturation des ARNr est désormais une signature de la maladie et est utilisée comme test fonctionnel de confirmation dans les cas douteux d'ABD.

- **RPL5 et RPL11**

Une modélisation chez *S. Cerevisiae* a montré que les protéines RPL5 et RPL11 sont liées à l'ARNr 5S et aux facteurs d'assemblage des levures Rpf2 and Rrs1 dans la grande sous-unité du ribosome 60S. En cas de non-association du complexe, la maturation du pré-ARNr 27SB est bloquée et cela conduit à la formation d'une pré-sous-unité 66S qui est exportée du nucléole vers le nucléoplasme, mais qui ne peut pas être exportée dans le cytoplasme [312].

D'autre part, il semble que RPL5 et RPL11 coopèrent pour recruter le complexe RISC et dégrader l'ARNm de c-Myc en cas de stress ribosomal [313]. C-Myc est un facteur de transcription proto-oncogène car il favorise la croissance cellulaire et la prolifération [314-315]. Non-régulé il induit une prolifération incontrôlée des cellules, ce qui conduit au cancer [316]. Myc régule la biogenèse des ribosomes en régulant l'expression transcriptionnelle des ARNr 18S, 5,8S et 28S, de certaines RPS et RPL ainsi que de facteurs importants pour la maturation des ARNr, l'assemblage du ribosome et l'export des particules pré-ribosomiques du noyau vers le cytoplasme comme la nucléoline, la nucléophosmine, la dyskérine (une pseudo-uridyl synthase impliquée dans la modification des snoRNPs) et la fibrillarine [316]. Myc régule également la transcription de facteurs d'initiation de la traduction comme eIF4E, eIF2 α , eIF4AI et eIF4GI [317]. Une étude dans des cellules érythroleucémiques de souris (MEL) montre que c-Myc est important en début d'érythropoïèse pour la prolifération des cellules. Cependant, sa surexpression au moment de l'érythropoïèse tardive inhibe l'expression des globines et de l'ALAS2 [317-318]. RPL11 peut interagir directement avec c-Myc et inhiber son activité [319].

Un rôle des protéines RPL5 et RPL11 dans l'apoptose en cas de stress des ribosomes a également été extensivement décrit. Le complexe RPL5/RPL11/ARN 5S (appelé aussi particule ribonucléoprotéique (RNP) 5S) est un acteur majeur de la régulation du ckeckpoint MDM2/P53 et donc de l'apoptose p53-dépendante [320] (**Figure 26**). La protéine MDM2 (Mouse Double Minute Homolog 2 ou HumanDM2 chez l'Homme) est une E3 ubiquitine ligase qui inhibe l'activité de p53 en orchestrant sa dégradation par le protéasome. Plusieurs RPs peuvent se lier à MDM2 grâce aux séquences TOP de leur extrémité 5'UTR comme RPL5 et RPL11. La fixation des RPs sur MDM2 permet l'activation de p53 qui est libre [321]. RPL5 se lie à l'ARNr 5S puis le complexe se lie à RPL11 dans le nucléole [321]. RPL5 et RPL11 sont mutuellement interdépendantes pour leur stabilité et leur accumulation quand la biosynthèse du ribosome est altérée [322].

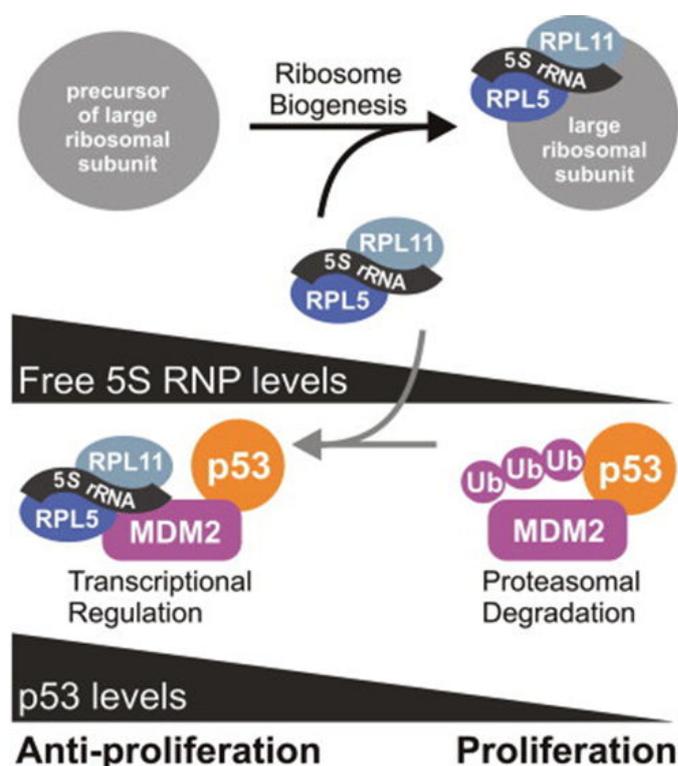


Figure 26. Le complexe 5S RNP (5S ARNr/RPL5/RPL11) active la p53 quand la synthèse de ribosome est altérée (image Sloan et al. [320]).

Il existe plusieurs points de contrôle pour vérifier que la traduction se déroule correctement. Le passage de ces points de contrôle requiert l'intégrité de la structure du ribosome. En cas d'haplo-insuffisance de gènes codants pour des protéines ribosomiques comme c'est le cas dans l'ABD, l'intégrité de cette structure peut être compromise [323]. Nous avons montré que RPL5 et RPL11 ont des fonctions régulatrices dans la cellule en cas de stress du ribosome. Elles répriment la biogénèse des ribosomes quand la traduction est

altérée grâce à l'inhibition de c-Myc. Enfin elles activent l'apoptose cellulaire en se fixant à MDM2 en coopération avec l'ARNr 5S. Ces mécanismes de régulation visent à éviter que les cellules qui pourraient mal traduire les ARNm à cause de ribosomomes non-fonctionnels puissent proliférer et donc *in fine* éviter la tumorigenèse.

D.2/ Les altérations de traduction dans l'ABD

D'autres RPs mutées dans l'ABD sont impliquées dans des anomalies de synthèse des ribosomes. L'équipe du Pr Gleizes a montré que les mutations de *RPS24* (p.Q106stop, p.R16stop et p.delE2-Q22) bloquent l'élimination de l'extrémité 5'ETS [310]. Les lignées lymphoblastoïdes mutées pour ce gène ont un taux élevé de pré-ARNr 30S en comparaison du pré-ARNr 18S-E. Une accumulation du pré-ARNr 18-SE et donc un défaut de maturation de la petite sous-unité du ribosome est aussi observée pour des mutations dans les gènes *RPS10* et *RPS26* [242]. La maturation des ARNr 5,8S et 28S de la grande sous-unité est altérée dans le cas de mutation des gènes *RPL35a* [289], *RPL5* et *RPL11* [245] (**Figure 27**).

L'ABD fut la première maladie du ribosome ou « ribosomopathie » décrite. Depuis d'autres maladies constitutionnelles dues à des mutations de gènes ribosomiques ont été caractérisées, comme le syndrome de Shwachman-Diamond, la dyskératose congénitale par mutation de la dyskérine, l'hypoplasie cartilage-cheveux [324][325] et plus récemment l'asplénie congénitale [326]. Seuls le syndrome de Shwachman-Diamond, la dyskératose congénitale et l'hypoplasie cartilage-cheveux s'accompagnent d'une insuffisance médullaire et appartiennent aux syndromes d'insuffisance médullaire. Ces ribosomopathies sont liées à des mutations dans des gènes qui codent pour des protéines impliquées également dans la maturation des ARNr à différents niveaux. Elles sont toutes associées à une prédisposition au risque de cancer, mais qui reste plus faible que dans l'anémie de Fanconi. Le gène *SBDS* muté dans le syndrome de Shwachman-Diamond est impliqué dans la maturation de la sous-unité 40S. Dans une forme de dyskératose congénitale (DKC), le gène *DKC1* de la dyskérine est muté. Le gène responsable de l'hypoplasie cartilage-cheveux code pour la RMRP qui est le composant ARN de la ribonucléase MRP et joue un rôle dans le clivage des pré-ARNs. Les RPs sont également impliquées dans des pathologies acquises. Récemment, des mutations dans les gènes *RPL10* et *RPL5* ont été identifiées au cours d'hémopathies malignes comme les leucémies aiguës lymphoblastiques [327] et plusieurs hémopathies myéloïdes dont les syndromes myélodysplasiques (SMD) par haplo-insuffisance en *RPS14*, les leucémies aiguës myéloïdes et la leucémie myéloïde chronique où *RPS27a* est augmentée [328]. Le syndrome 5q- est un syndrome myélodysplasique particulier dont les anomalies notamment de

l'érythropoïèse sont liées à une haplo-insuffisance en RPS14 [329]. Cette maladie est caractérisée par une anémie macrocytaire et une thrombocytose secondaire à une myélodysplasie touchant surtout la lignée mégacaryocytaire. Le syndrome 5q- est particulier par son faible risque d'évolution (10%) vers une leucémie en comparaison des autres SMD. Au cours du syndrome 5q-, il a pu également être montré une activation de la voie p53 due à son relargage par MDM2 (ou HDM2 chez l'Homme) [212].

Ces ribosomopathies sont liées à des RPs différentes et n'impliquent pas les mêmes mécanismes physiopathologiques. Cependant elles aboutissent souvent à des perturbations de l'érythropoïèse et mettent en évidence une relation d'interdépendance entre celle-ci et la biosynthèse des ribosomes. Dans le cas de l'ABD, il est effectivement très étonnant qu'une altération du ribosome et donc de la traduction protéique qui est un processus ubiquitaire dans l'organisme puisse avoir pour principale conséquence un défaut de production des globules rouges.

Nous avons émis l'hypothèse que les progéniteurs érythroïdes immatures pourraient être très sensibles à des insuffisances en RPs par rapport à d'autres cellules en raison du nombre considérable de globules rouges générés chaque jour (200 milliards). Les globules rouges sont les cellules les plus produites par l'organisme. On peut imaginer que si le défaut existe dans tous les types cellulaires, il est plus visible dans les cellules à haut pouvoir prolifératif. Des taux de synthèse d'ARN qui surpassent les taux de prolifération cellulaires ont été montrés dans des cultures primaires érythroïdes [261]. Une haplo-insuffisance en RP pourrait aussi aboutir à inhiber d'autres RPs comme cela a été montré pour RPS19 induisant une réaction en cascade. En effet, l'équipe d'Hana Gazda [284] a montré que les cellules médullaires de certains patients ABD mutés pour *RPS19* ont une diminution de l'expression de plusieurs protéines ribosomiques comme RPS10, RPS14, RPS28, RPL10L, RPL14, RPL15, RPL18, RPL18A, RPL28 et RPL36 ainsi que des protéines impliquées dans la transcription et la traduction, telles que les facteurs d'initiation EIF5B et EIF2C2 et les facteurs d'élongations EEF1D et EEF1E1. Les forts taux de traduction que requiert la synthèse des globines pourraient expliquer pourquoi ces mutations ont des conséquences plus visibles dans la lignée érythroïde.

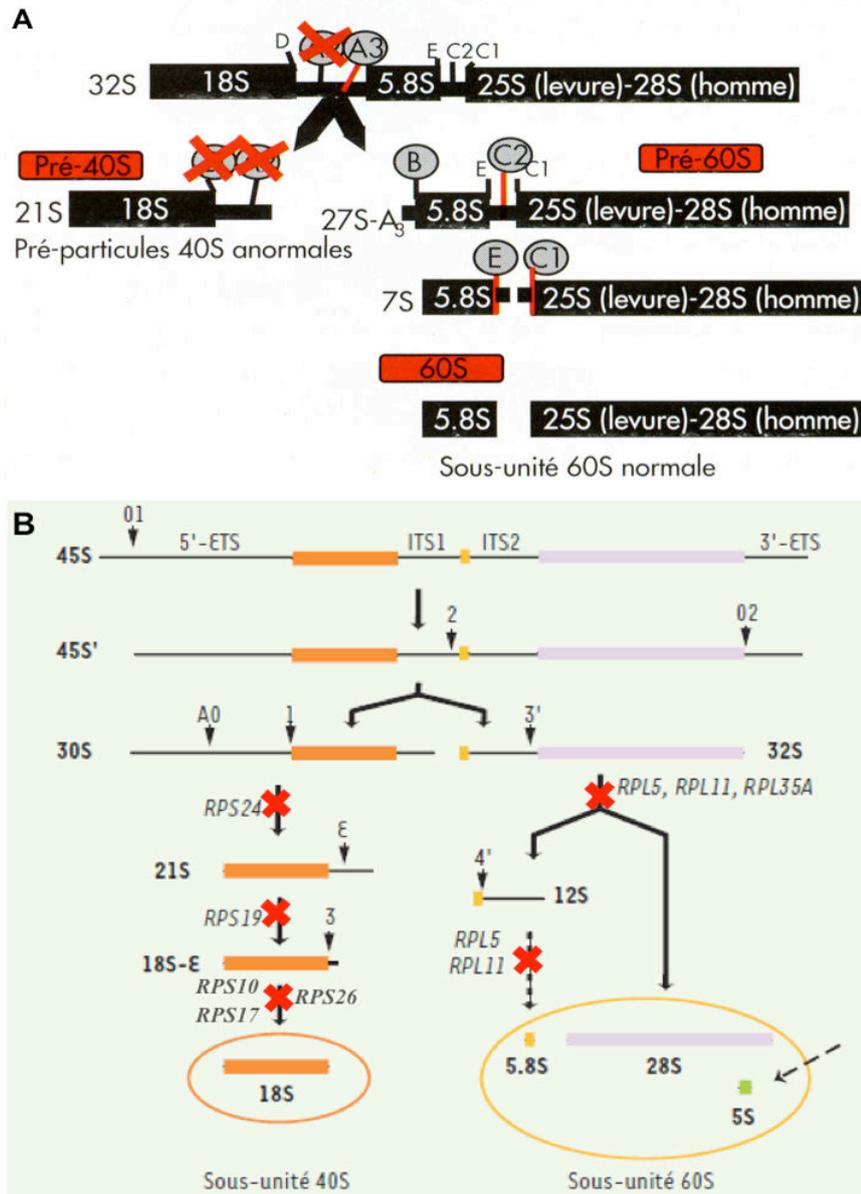


Figure 27. Anomalies de la maturation des ARNr en fonction des gènes mutés au cours de l'ABD. A/ Anomalies associées à la mutation de *RPS19* : absence de clivage au site A2 en 3'-UTR de l'ITS1 (image Da Costa et al. [268]). B/ Anomalies de la maturation des ARNr 18S, 28S et 5,8 S en fonction du gène de RP muté (image Aguisa-Touré et al. [244]).

Anu Narla et Ben Ebert ont proposé deux hypothèses pour expliquer le tropisme érythroïde de l'ABD [325]. Dans la première (hypothèse A **Figure 28**), l'haplo-insuffisance des RPs conduit à l'altération de la biogenèse des ribosomes qui aboutit à une accumulation de la protéine RPL11 libre. Comme décrit précédemment RPL11 en partenariat avec RPL5 et l'ARNr 5S est responsable de l'activation de la p53 qui induit l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose en cas de stress ribosomique. Dans la deuxième hypothèse (hypothèse B **Figure 28**), un défaut de la synthèse des chaînes de globines induit une diminution de la formation de l'hémoglobine et une accumulation toxique d'hème dans les érythrocytes qui induit la destruction cellulaire par hémolyse ou du fait d'un stress oxydatif [325]. Cette hypothèse est

confortée par les résultats obtenus et décrits précédemment sur FLVCR1 et l'inactivation de cette protéine dans les modèles animaux qui suggèrent une accumulation d'hème dans les érythroblastes dans l'ABD. Les deux hypothèses ne sont pas contradictoires et pourraient toutes les deux être vraies. L'apoptose observée dans l'ABD peut être induite par différents mécanismes.

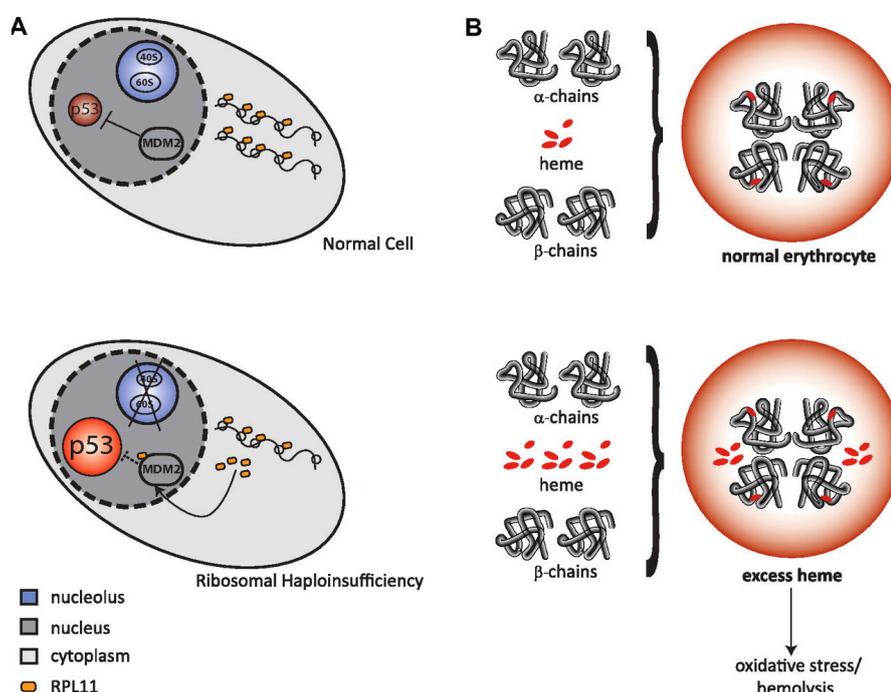


Figure 28. Conséquences de l'altération de la biogenèse du ribosome au cours de l'ABD. Deux hypothèses pourraient expliquer les mécanismes physiopathologiques observés au cours de l'ABD. **A/** hypothèse A. **B/** hypothèse B (image Narla et Ebert [325])

IV/ Le projet de recherche et les objectifs de la thèse

Comme nous l'avons vu, les raisons du tropisme érythroïde de l'anémie de Blackfan-Diamond sont peu connues. Le but de notre projet de recherche est donc de comprendre les mécanismes physiopathologiques qui sont responsables du tropisme érythroïde de l'ABD et de l'atteinte de l'érythropoïèse chez les malades. Le modèle du chat atteint par le Feline Leukemia Virus de type c (FLVc) qui présente un tableau clinique proche de celui observé dans l'ABD a orienté notre projet vers l'étude de l'exporteur d'hème FLVCR1 et du métabolisme de l'hème au cours de l'ABD. Des équipes avaient montré que l'expression de FLVCR1 pouvait être altérée dans l'ABD [169][178] et que cette protéine était essentielle au bon déroulement de l'érythropoïèse [170][173]. Le premier objectif de ma thèse était donc de caractériser l'expression de FLVCR1 et de voir si il pouvait être un facteur aggravant de l'ABD. Nous pensions que l'expression de FLVCR1 pouvait être diminuée, et que l'accumulation d'hème intracellulaire pouvait induire des FRO et participer à l'activation

de l'apoptose observée dans cette maladie. Alors que nous pensions que l'expression de FLVCR1 serait diminuée ou que la protéine ne serait pas fonctionnelle chez les patients, nos résultats préliminaires ont montré au contraire une augmentation de l'expression de cette protéine tout au long de la différenciation chez des patients étudiés.

Pour comprendre l'ensemble des processus impliqués qui suggéraient à priori un excès d'hème dans ces cellules par dépassement des capacités d'export de FLVCR1, nous avons étudié l'expression d'acteurs majeurs du métabolisme de l'hème et du fer au cours de l'érythropoïèse. Nous avons ainsi choisi d'étudier certaines protéines liées au métabolisme de l'hème (ALAS2, ferrochélatase, HMOX1 et FLVCR1), du fer (CD71, DMT1 forme IRE-dépendante, ferritine et hepcidine), de la traduction des globines (EIF2 α , HRI, les globines α et β) et de la régulation transcriptionnelle de l'érythropoïèse (les facteurs de transcription GATA-1 et Bach1).

Les objectifs de ma thèse ont été de comprendre pourquoi l'expression de FLVCR1 était augmentée chez les patients.

1/ Si il s'agissait un excès d'hème à exporter, il fallait mettre en évidence cet excès d'hème par des dosages et confirmer cette surcharge en étudiant l'expression de Bach1 et HRI qui sont régulés par lui.

2/ Enfin, pour trouver l'origine de la surcharge d'hème, nous avons vérifié si l'excès d'hème était dû à A/ une augmentation de sa synthèse (ALAS2, FECH) par régulation transcriptionnelle (GATA-1) ou B/ due à une altération du métabolisme du fer (CD71, DMT1 forme IRE-dépendante, ferritine et hepcidine) ou C/ due à sa mauvaise incorporation aux globines suite à une altération de la traduction (EIF2 α , HRI, les globines α et β).

Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé des cellules CD34⁺ issues de sang périphérique de patients, des cellules CD34⁺ issues de sang de cordon transduites par des lentivirus contenant des séquences d'ARN interférents dirigés contre les trois protéines ribosomiques les plus fréquemment mutées chez les patients atteints d'ABD (RPS19, RPL5 et RPL11) et des plasmas de patients.

MATERIELS
ET
METHODES

I/ Culture cellulaire

- **Cellules primaires CD34⁺**

Des CD34⁺ issues de sang de cordon (expériences shARN) ou de sang périphérique de patients atteints d'ABD et de contrôles sains ont été isolées. Les poches de sang de cordon viennent de l'unité de thérapie cellulaire de l'hôpital St-Louis (Paris) du Pr Larghero. Les patients sont suivis par le Dr Thierry Leblanc à l'hôpital St-Louis ou à l'Hôpital Robert Debré à Paris. Les CD34⁺ sont purifiées après ficoll grâce à un marquage de billes magnétiques du kit CD34⁺ MicroBead isolation (Miltenyi Biotec, Paris, France). Deux milieux de culture différents ont été utilisés pour la différenciation érythroïde des cellules *in vitro*.

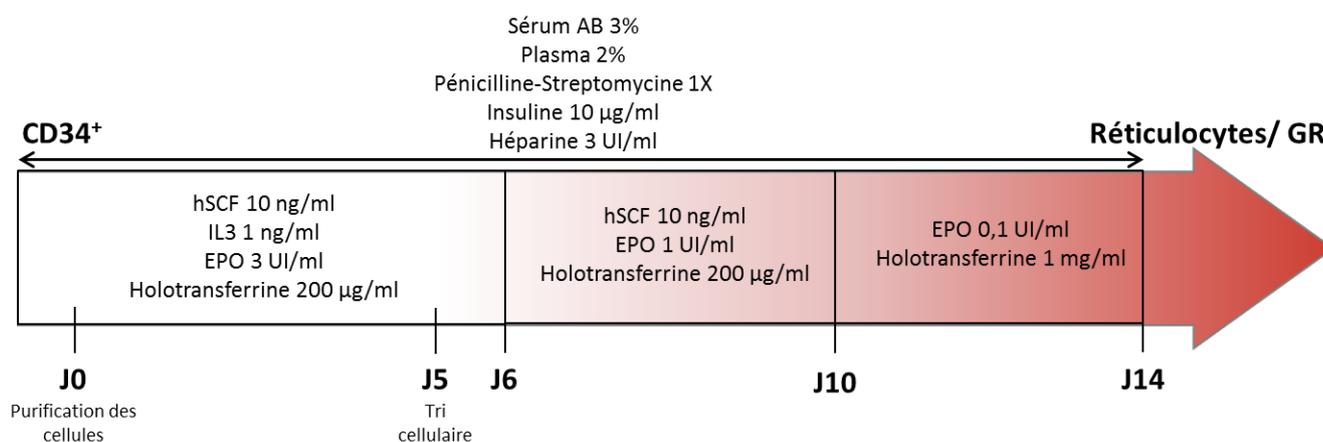
Milieu avec SVF

Ce milieu était utilisé par notre équipe au début de la thèse. Il s'agit d'un milieu IMDM (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) avec 1% de L-Glutamine (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 1% de Pénicilline/Streptomycine (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 0,076 mM d' α -monothioglycérol (Sigma-Aldrich, Lyon, France), 300 μ g/ml d'holotransferrine (Sigma-Aldrich, Lyon, France), 1% de liposomes, 50 ng/ml de hSCF, 1 UI/ml d'IL-3, 1 UI/ml d'érythropoïétine (EPO) et 10% de SVF (GE Healthcare, Orsay, France). A partir du septième jour de culture, la concentration de SVF passe à 30% du volume final.

Milieu sans SVF (collaboration et utilisation du milieu de culture de Narla Mohandas)

Ce protocole permet une synchronisation cellulaire des cellules aux stades BFU-E et CFU-E vers le sixième jour de culture cellulaire après tri au cytomètre (FACS Aria III Cell Sorter, Becton Dickinson, San Jose, USA) car les différentes étapes de la différenciation érythroïde ont été bien caractérisées pour ce milieu par l'équipe de N. Mohandas du New York Blood Center de New-York. Il s'agit d'un milieu IMDM + glutamax (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) qui contient du sérum humain de type AB (Sigma-Aldrich, Lyon, France #H4522), du plasma (human peripheral blood plasma, Stemcell Technologies, Sheffield, United Kingdom #70039), de l'insuline (recombinant human insulin, Sigma-Aldrich, Lyon, France #91077C), de l'héparine (Sigma-Aldrich, Lyon, France #H3149), de l'holotransferrine (Sigma-Aldrich, Lyon, France #T4132), du hSCF (Miltenyi Biotec #130-

096-695), de l'IL-3 humaine recombinante (Stemcell Technologies, Sheffield, United Kingdom #2503), de l'EPO (Life Technologies, Carlsbad, USA #PHC2054) et de la pénicilline-streptomycine. Le protocole est en trois étapes (J0-J6/ J6-J10/ J10-J14). Les concentrations finales de sérum AB sont de 3%, plasma 2%, pénicille/streptomycine 1X, insuline 10 µg/ml et héparine 3 UI/ml tout au long du protocole. De J0 à J10, la concentration finale de hSCF est de 10 ng/ml après il n'y en a plus. De J0 à J6 uniquement, l'IL3 est ajoutée au milieu de culture à une concentration finale de 1 ng/ml. De J0 à J6, l'EPO est à 3 UI/ml, de J6 à J10 à 1 UI/ml et de J10 à J14 à 0,1 UI/ml. De J0 à J10 la concentration d'holotransferrine est de 200 µg/ml et de J10 à J14 elle est égale à 1 mg/ml.



- **Infection des cellules avec les lentivirus**

Au bout du premier jour de culture en milieu de différenciation, les cellules concentrées à 400 000 cellules/ml/puit en plaque 24 puits sont infectées avec les lentivirus en utilisant une MOI de 50 (virus titrés sur des cellules UT7). Il y a une double-infection des cellules par le virus-shRPS19 à 6h d'intervalle. Les cellules sont lavées au bout de 24h et triées à J5 sur leur viabilité (DAPI) et leur fluorescence (tag GFP et/ou mcherry). Après tri, les cellules sont resuspendues à 200 000 cellules/ml/puits de plaque de 24 puits tout au long de la différenciation.

II/ Cytométrie de flux

Pour la synchronisation des cellules aux stades BFU-E et CFU-E à J6, les cellules sont marquées avec des anticorps anti-IL3R couplé à phycoérythrine-cyanine 7 (eBioscience, Paris, France #25-1239-42), anti-CD34 couplé à la phycoérythrine (Becton Dickinson, San Jose, USA #555822) et anti-CD36 couplé à l'allophycocyanine (Biolegend, Londres, Angleterre #336208). On isole les cellules IL3R⁻CD36⁻CD34⁺ qui sont les BFU-E et les cellules IL3R⁻CD36⁺CD34⁻ qui sont les CFU-E.

Pour quantifier l'expression protéique de FLVCR1 par cytométrie de flux, nous avons utilisé le kit FLVCR1-R100 (Metafora, Evry, France). Cet anticorps est une protéine de fusion entre la partie Fc d'un anticorps de lapin et la partie de l'enveloppe du feline leukemia virus de type c (FLVc) qui interagit avec FLVCR1a. Les cellules sont ensuite marquées avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à l'Alexa Fluor 647 (Invitrogen, Carlsbad, USA #A-21244).

III/ Vecteurs plasmidiques et production des lentivirus

Des shARN anti-protéine ribosomique 5 (shRPL5), 11 (shRPL11), 19 (shRPS19) et un shARN contrôle (shcontrôle) ont été utilisés. Ils ont été générés lors d'un précédent projet [213]. Les constructions sont sous promoteur H1 dans un plasmide lentiviral pRRLsin-PGK-WPRE-eGFP exprimant la protéine GFP. L'ADNc de HSP70 sauvage est transduit grâce à un lentivirus. Les plasmides lentiviraux ont été générés par Marc Gastou (étudiant en thèse, co-direction Prs E. Solary/L. Da Costa, U1170, IGR, Villejuif) et expriment la protéine mcherry. Les plasmides sont des constructions pTRIP-ZEPHYR-mCherry (shcontrôle mcherry) ou pTRIP-ZEPHYR-HSP70-mCherry (HSP70 sauvage). Nous avons produit les virus en laboratoire L3 à l'institut Gustave Roussy (U1170, Pr E. Solary/Pr O. Bernard) par transfection des plasmides dans des cellules HEK293 compétentes grâce au jetPRIME (Polyplus transfection, Illkirch, France).

IV/ Transcription inverse et PCR quantitative

Les ARNs totaux ont été extraits en utilisant du trizol RNA-PLUS™ (MP Biomedicines, Illkirch, France). 500 ng à 1 µg d'ARN (Nanodrop Thermo Scientific, Wilmington, USA) ont été utilisés pour la transcription inverse réalisée avec le kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase (Thermo Scientific, Illkirch, France) selon le protocole du fournisseur.

La PCR quantitative (PCRq) a été réalisée avec le kit LightCycler® DNA Master SYBR Green I sur un thermocycleur LightCycler® 96/384 puits (Roche, Bale, Suisse). Des amorces spécifiques de chaque gène ont été utilisées (**Tableau 2**).

Gène cible	Amorces 5' → 3'
Hémoglobine β	GCACGTGGATCCTGAGAACT GGCCCTTCATAATATCCCCCA
Hémoglobine α	AGCCTCGGTAGCCGTTT ACTCAGACTTTATTCAAAGACCAGG
Récepteur à la transferrine 1	GCTGCAGGTTCTTCTGTGTGGCA CGAGCCAGGCTGAACCGGGTA
GATA-1	TCCCAAGCTTCGTCTGAACTC CGTTGCATAGGTAGTGGCCT

Gène cible	Amorces 5' → 3'
EIF2 α	CTGGGGCAATGGAGAAAAAGTA GTATCCCAGCTGTGCCATCTTT
ALAS2	AGGATGTGTCCGTCTGGTGTA TGAAACTTACTGGTGCCTGAGA
Ferrochélatase	TTCCTATTCAGCATAAGCTGGCACCAT GCCTCCAATCCTGCGGTA CTG
FLVCR1a	TCGCCTCAGTGTGGTTTGG GGTGGTAGCAAAAAGCCA ACT
RPL5	GCTGTGGATGGAGGCTTGTC CATTAAATTCCTTGCTTTCAGAATCA
RPL11	TTGGTATCTACGGCCTGGACTT GATTCTGTGTTTGGCCCAAT
RPS19	CTGTTCCCTCCAGCCACGAA GGATAGAGAGCTCCTGTTCGG
Actine β	CTGGAACGGTGAAGGTGACA AAGGGACTTCTGTAAACAACGCA
β_2 -microglobuline	CCTGTTCGACAGTCAGCCG CGACCAAATCCGTTGACTCC
Heme Regulated kinase (HRI)	AGAAGGTTCTACCGCAGAAATTGA TGAAAGGGGCAGGAAGACTG
Bach 1	TGCTGAGCTGGATTTAGCGA CGTGGGCAAACTCCAACAA

Tableau 2 : séquences des amorces de PCR quantitative (SYBRGreen)

L'analyse des résultats a été réalisée en utilisant la méthode de calcul $\Delta\Delta C_t$. Les ADNc des échantillons de l'expérience étaient mélangés au ratio 1/1 pour faire une gamme de concentrations relatives 1 ; 1/2; 1/4; 1/8; 1/16 et déterminer les efficacités de la PCRq pour chaque amorce. Des puits contenant de l'eau ultrapure nous ont permis de contrôler l'absence de contamination et la spécificité de la réaction de PCR. Les points des échantillons ont été déposés en triplicate. Les gènes analysés ainsi que les gènes rapporteurs (*actine β* et *β_2 -microglobuline*) ont été déposés sur une même plaque 384 puits pour chaque expérience.

V/ Immuno-buvardage

Des culots de 50 000 (patients) ou 100 000 cellules (expériences shARN) sont resuspendus dans un tampon de lyse (50 mM final de Tris/HCL pH 7,6, 150 mM de NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton, 24 μ g/ml AEBSF, un cocktail inhibiteur de protéases (Roche, Bale, Suisse) et un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases. Les surnageants cellulaires sont dénaturés à 95°C pendant 5 min en présence d'un tampon dénaturant au ratio 1:1 (β -mercaptoéthanol, 10% glycérol, 0,2% de bleu de bromophénol). L'électrophorèse des protéines sur gels Tris-Glycine à 10% dans un tampon SDS se déroule à 100V ainsi que le transfert liquide des protéines sur membrane de nitrocellulose (GE Healthcare, Vélizy, France) qui dure 100 min. Après le transfert, la charge en protéine des différents puits est déterminée grâce à une coloration au rouge Ponceau. Après plusieurs lavages avec de l'eau

déminéralisée et du TBS tween 0,1%, les membranes sont saturées 1h avec du lait écrémé à 5% dans du TBST 0,1% à température ambiante et immuno-marquées à 4°C toute la nuit avec les anticorps primaires au 1:1000^{ème}.

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : chèvre anti-FLVCR1 (Novus Biological, Lille, France #NB100-1481), souris anti-hémoglobine β (Santa Cruz Technologies, Heidelberg, Allemagne #sc-21757), souris anti-CD71 (Santa Cruz #sc-65882), souris anti-HSP70 (Enzo life sciences, Villeurbanne, France #ADISPA810), lapin anti-hémoglobine α (Abcam, Cambridge, United Kingdom #ab102758), lapin anti-ferrochelatase (Abcam #ab137042), lapin anti-GATA-1 (Abcam #ab173816), lapin anti-EIF2 α (Santa Cruz (clone FL-315) #sc-11386), lapin anti-p-EIF2 α (Santa Cruz #sc-101670), lapin anti-RPL5 et souris anti-RPS19 (Abcam #ab57643), lapin anti-RPL11 (fourni par le laboratoire du Dr PE Gleizes et du Dr MF. O'Donohue, LBME, Toulouse) et lapin anti-ALAS2 (collaboration avec Agios pharmaceuticals), lapin anti-humain Bach1 (Abcam #ab124919), lapin anti-HRI (Millipore, Billerica, USA #07-728) and souris anti-actine β (Sigma-Aldrich #A2228) et souris anti-GAPDH (Santa Cruz #sc-365062).

Après plusieurs lavages avec de l'eau déminéralisée et du TBS tween 0,1%, les membranes sont incubées 2h à température ambiante avec des anticorps secondaires couplés à la peroxidase de raifort (HRP) : mouton anti-souris (GE healthcare #45001275), chèvre anti-lapin (Interchim #669630) ou singe anti-chèvre (Jackson Immuno Research #705-035-003). Après plusieurs lavages, les protéines sont révélées grâce un substrat luminescent de la HRP "ECL Luminata Forte" (Millipore, Billerica, USA).

VI/ Quantification de l'hème

- **Hème total**

L'hème cellulaire total a été dosé en utilisant le kit QuantiChromTM Heme Assay (DIHM-250) (Gentaur, Kampenhout, Belgium) en plaque 96 puits. Un culot cellulaire de 100 000 cellules minimum est lysé dans 50 μ l d'eau déminéralisée, chauffé à 95°C pendant 5 min pour lyser les membranes cellulaires et libérer l'hème hydrophobe et centrifugé 5 min à 1500 rpm. La concentration d'hème cellulaire est déterminée d'après la lecture optique des surnageants à 400 nm après ajout de 200 μ l de tampon sur tous les puits en utilisant la formule suivante : hème total (en μ M) = $((DO_{\text{échantillon}}_{400\text{nm}} - DO_{\text{blanc}}_{400\text{nm}}) / (DO_{\text{standart}}_{400\text{nm}} - DO_{\text{blanc}}_{400\text{nm}})) * [\text{standart}] * \text{volume de dilution}$ où le standart est 50 μ l d'hème pur à 62,5 μ M fournit par le fournisseur et le blanc 50 μ l d'eau déminéralisée. Les

concentrations des conditions étudiées sont normalisées par rapport au contrôle (shcontrôle ou témoin) fixé arbitrairement à 1.

- **Ratio «hème libre» / hémoglobine**

Le dosage d'hème libre a été optimisé grâce à une collaboration avec le Dr Slim Azouzi de l'Institut National de Transfusion Sanguine (INTS) au sein du laboratoire d'Yves Colin-Aronovicz. Un culot cellulaire de 100 000 érythroblastes minimum est lysé dans 50 µl d'un tampon basique de NaOH 0,1M + un cocktail inhibiteur de protéases (Roche) et centrifugé 5 min à 1500 rpm. Les surnageants sont distribués dans une plaque 96 puits. Des gammes d'hémine et d'hémoglobine humaine sont réalisées dans le même tampon. Une lecture spectrophotométrique d'absorbance est réalisée entre 200 nm et 800 nm tous les 5 nm. Trois pics d'intérêts ressortent de l'analyse des surnageants des érythroblastes en comparaison des gammes et des contrôles internes. Le pic de 380 nm ou bande de Soret montre l'absorbance de tous les tétrapyrroles conjugués de la cellule non-incorporés à l'hémoglobine (le principal étant l'hème dans ces cellules). L'hémoglobine absorbe vers 560 nm. Le ratio des absorbances 380/560 nm permet de mesurer la proportion d'hème libre dans la cellule par rapport à l'hème globinique.

VII/ Quantification des FRO

Deux techniques de dosage des FRO différentes ont été utilisées. Pour la première méthode, 10 000 cellules sont lavées avec un tampon PBS sans calcium ni magnésium et resuspendues dans 500 µl de Hank's Balanced Salt Solution sans rouge phénol (Invitrogen) avec 10 µM de luminol et 2,5 UI/ml de HRP. Cette méthode de dosage des FRO a été optimisée grâce à une collaboration avec le Dr Jamel El Benna du centre de recherche sur l'inflammation (INSERM U1149). Les échantillons sont incubés 200 min à 37°C dans l'obscurité dans un luminomètre Autolumat LB953 (EG&G Berthold, Bad Wildbad, Germany). La production relative des FRO est calculée en faisant le ratio de l'intégrale de la courbe de l'échantillon sur l'intégrale de la courbe du contrôle pendant ces 200 min. Le luminol permet de détecter le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, l'oxyde nitrique NO, les radicaux (R) peroxydes ROO⁻, l'ion peroxy-nitrique ONOO⁻ et l'ion superoxyde O₂⁻ en présence de HRP.

Pour la seconde méthode, nous avons utilisé un kit de cytométrie le CellROX® Deep Red Reagent kit (Invitrogen, Carlsbad, USA). Le réactif CellROX® Deep Red est perméant et permet de détecter les FRO dans le cytoplasme des cellules. Ce réactif n'est pas fluorescent à l'état réduit, mais il devient fluorescent en cas d'oxydation par les dérivés réactifs de

l'oxygène. Les valeurs maximales d'émission sont mesurables vers 665 nm par cytométrie de flux, ce qui permet de détecter des FRO dans les cellules exprimant les protéines GFP et mcherry. Les FRO détectées grâce à ce kit sont le radical hydroxyle et l'ion superoxyde.

VIII/ Quantifications de l'hepcidine, de l'érythropoïétine et de l'hémopexine dans les plasmas de patients et bilans martiaux

- **Quantification sérique de l'hepcidine**

La quantification sérique de l'hepcidine a été réalisée par Thibaut Lefèbre au centre français des porphyries de l'hôpital Louis Mourier à Colombes selon une technique de quantification en spectroscopie de masse qu'il a développée [330].

- **Bilans martiaux**

Les concentrations sériques de fer, de transferrine et de ferritine chez les patients atteints d'ABD été mesurées au centre français des porphyries par Thibaut Lefèbre. La capacité de liaison du fer et la saturation de la transferrine ont été calculées à partir de ces résultats.

- **Quantification sérique de l'érythropoïétine et de l'hémopexine par ELISA**

L'érythropoïétine et l'hémopexine plasmatiques des patients ont été quantifiées par ELISA avec les kits Quantikine IVD ELISA (R&D Systems #DEP00) et hemopexin (HPX) human ELISA (Abcam #ab108859).

IX/ Analyses statistiques

- **Dosages d'hème total**

Les statistiques (moyennes et écart-types) ont été faites entre les valeurs obtenues pour trois expériences différentes. Le test student t a été utilisé pour calculer les significativités des différences obtenues entre les conditions contrôles (non-infecté, shcontrôle ou ctrl (contrôle)) et les autres conditions.

- **RT-PCRq**

Les statistiques (moyennes et écart-types) ont été faites entre les valeurs obtenues pour trois expériences différentes (expériences shARN) ou un triplicata d'une même expérience (patients). Le test student t a été utilisé pour calculer les significativités des différences obtenues entre les conditions contrôles (non-infecté, shcontrôle ou ctrl (contrôle)) et les autres conditions.

RESULTATS

I/ Etude de l'ABD dans le modèle shARN

Pour étudier l'érythropoïèse dans l'ABD, nous avons utilisé des cellules CD34⁺ issues de sang de cordon transduites avec des lentivirus (voir partie M&M) contenant des shARN anti-RPL5, anti-RPL11, anti-RPS19 ou shcontrôle. Les cellules CD34⁺ sont purifiées à J0, infectées à J1 pendant 24h et triées à J5. Pour la condition RPS19, nous faisons une double-infection. Le tri cellulaire est réalisé sur la base de l'expression de la GFP (Green Fluorescent Protein) par rapport aux cellules non-infectées (témoin négatif) et de leur viabilité (DAPI). Les cellules sont cultivées à 200 000 cellules/ml/puit en plaque 24 puits jusqu'à J9. L'efficacité de l'extinction des RPs à J9 est montrée **figure 29**.

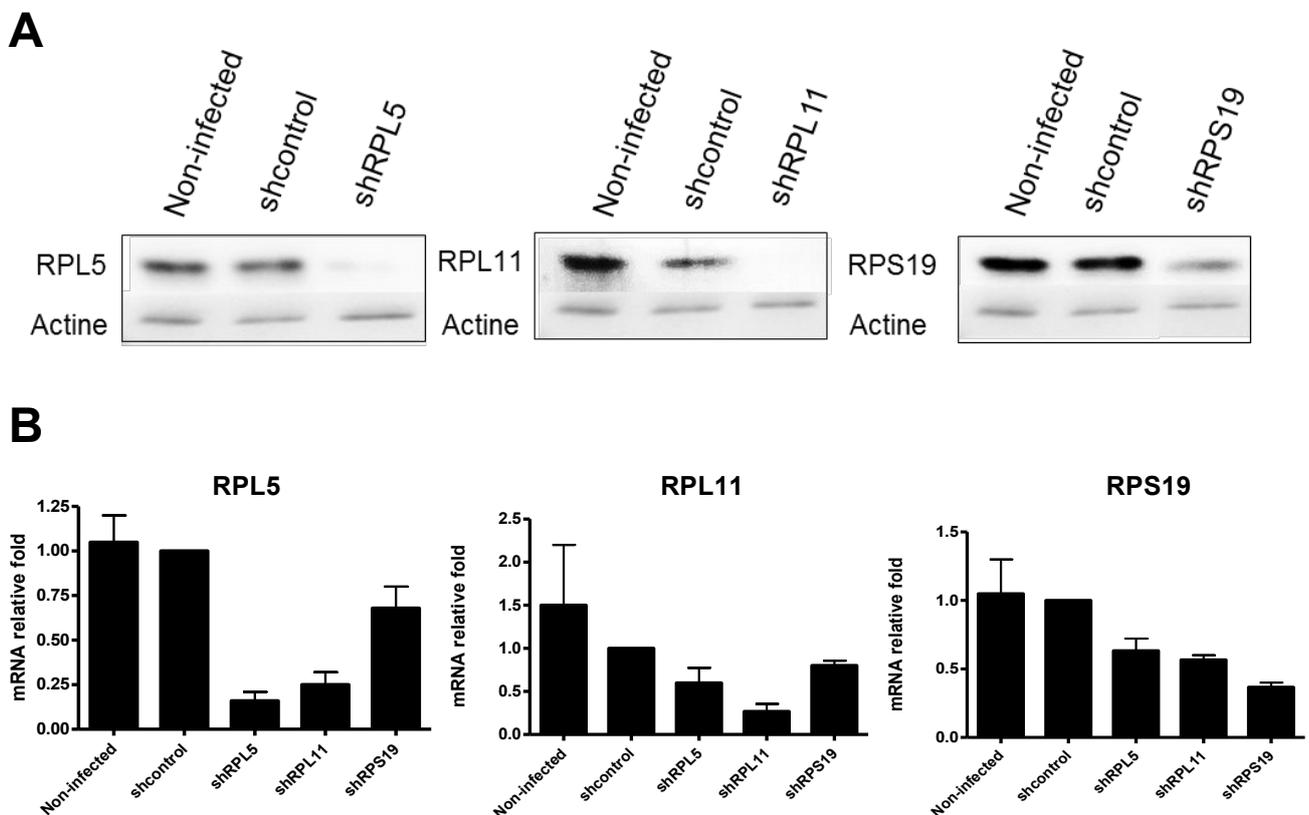
A/ Efficacité du modèle shARN

Figure 29. Efficacité du modèle shARN dans des CD34⁺ issues de sang de cordon à J9. **A/** Expression protéique de RPS19, RPL5 et RPL11 après extinction de leurs expressions géniques respectives par des shARN. **B/** Expression transcriptionnelle de RPS19, RPL5 et RPL11 par rapport à l'actine β après extinction par des shARN spécifiques. Moyenne et écart-type de trois expériences indépendantes.

L'inhibition transcriptionnelle de RPS19 par cette méthode est de 60% en moyenne (**Figure 29B**). L'expression de la protéine est diminuée. L'inhibition transcriptionnelle de RPL5 et RPL11 par rapport au contrôle est de 80% en moyenne et s'accompagne d'une nette réduction de l'expression protéique. Malheureusement, le contrôle du niveau d'extinction ne peut être régulé. On remarque que l'inhibition de RPL5 entraîne celle de RPL11 dans une moindre mesure mais de façon significative, et inversement comme précédemment décrit [348].

B/ Mise en évidence d'une surcharge en hème libre et d'un défaut de synthèse des chaînes de globines dans l'ABD

Des mesures d'hème total ont été réalisées sur des culots secs de 100 000 cellules par condition (**Figure 30A**). Les résultats montrent une quantité d'hème total réduite de 40% en moyenne dans les conditions shRPL5 et shRPL11 par rapport à la condition contrôle (shcontrôle). La quantité d'hème totale est aussi réduite dans la condition shRPS19, mais dans une proportion moindre (25% en moyenne). Un balayage du spectre entre 230 et 680 nm permet d'avoir une idée de la quantité de tétrapyrroles libres dans la cellule en faisant le rapport de la $DO_{380/400nm}$ (bande de Soret figurant tous les tétrapyrroles conjugués libres dans le culot cellulaire) sur la DO_{560nm} qui correspond au pic d'hémoglobine. Le rapport des deux densités optiques permet de mesurer indirectement la proportion d'hème libre (non incorporé aux globines) dans les cellules. Cette méthode qui a été développée par Slim Azouzi à l'INTS suppose l'approximation que dans des cellules $CD34^+$ en différenciation érythroïde la majorité des tétrapyrroles conjugués présents dans la cellule soit de l'hème. On peut voir une quantité relative d'hème libre augmentée de 5% en moyenne dans les conditions shRPL5 et shRPL11 et de 1,5% en moyenne pour la condition shRPS19 par rapport à la condition contrôle (**Figure 30C**). Cette méthode permet aussi de mettre en évidence un déficit d'hémoglobinisation important dans les conditions shRPL5 et shRPL11 et moindre pour la condition shRPS19 en comparant les intensités des pics 2 (**Figure 30C**). D'autre part, on observe une production de FRO importante dans les conditions shRPL5 et shRPL11 et intermédiaire pour le phénotype shRPS19 (**Figure 30B**), en cohérence avec les quantités d'hème libre mesurées. Le phénotype intermédiaire des cellules shRPS19 par rapport aux phénotypes des cellules shRPL5 et shRPL11 est confirmé dans chaque expérience, ce qui souligne la significativité des résultats obtenus.

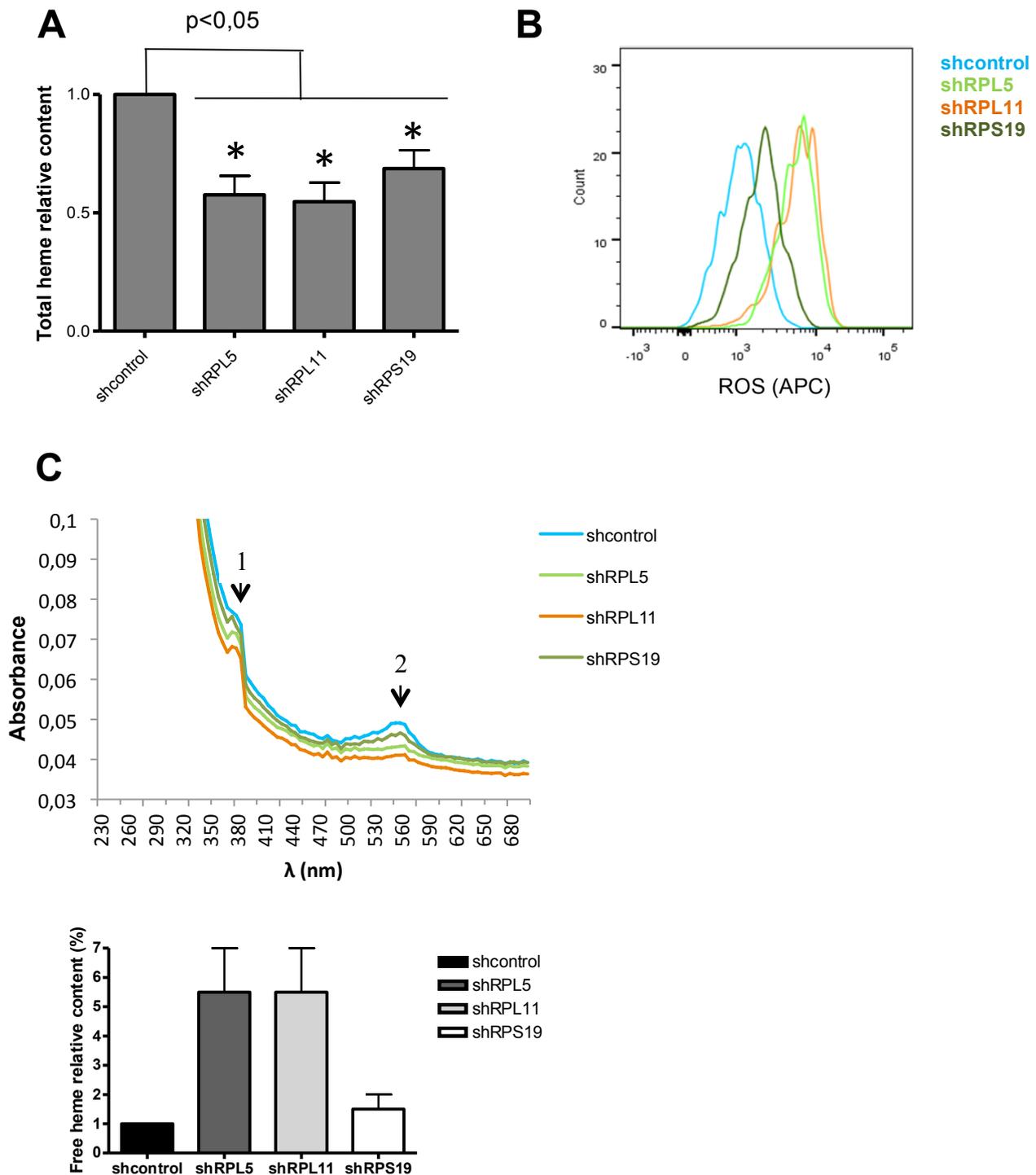


Figure 30. Surcharge en hème libre dans les conditions shRPL5, shRPL11 et shRPS19 à J9. **A/** Dosage d'hème total dans 100 000 cellules shcontrôle, shRPL5, shRPL11 et shRPS19 au neuvième jour de culture (n=3). **B/** Production de FRO mise en évidence par cytométrie de flux à J9 (représentatif de trois expériences différentes). **C/** Dosage spectrophotométrique de 100 000 cellules minimum shcontrôle, shRPL5, shRPL11 et shRPS19 à J9 (Pic 1) Bande de Soret (Pic 2) Hémoglobine. Quantification du % d'hème libre rapporté au shcontrôle (=1), moyenne et écart-type calculés sur deux expériences. *=P < 0,05

Le défaut d'hémoglobination des cellules shRPL5, shRPL11 et shRPS19 est encore plus visible au douzième jour de culture (**Figure 31 pic 2**). Des mesures d'hème libre ont été réalisées le septième (J7), le neuvième (J9) et le douzième jour de culture (J12). Les quantités d'hème libre mesurées étaient maximales à J9 pour les conditions shRPL5, shRPL11 et shRPS19. Cependant, l'inhibition des RPs dans ce modèle décroît au cours du temps (plus que 20 à 40% d'extinction transcriptionnelle de RPL5 et RPL11 à J12) et l'effet maximal observé à J9 peut être dépendant de cette diminution d'inhibition des gènes d'intérêt. Bien qu'on ait une diminution transcriptionnelle des RPs plus importante à J7, l'hémoglobine est peu exprimée à ce moment de la différenciation, ce qui rend difficile les analyses. C'est en faisant un choix entre une bonne inhibition transcriptionnelle des RPs, des conditions d'hémoglobination satisfaisantes et un nombre de cellules assez important pour réaliser toutes les expériences qu'a été choisi le jour de cinétique J9 pour l'ensemble des mesures et analyses de ce projet.

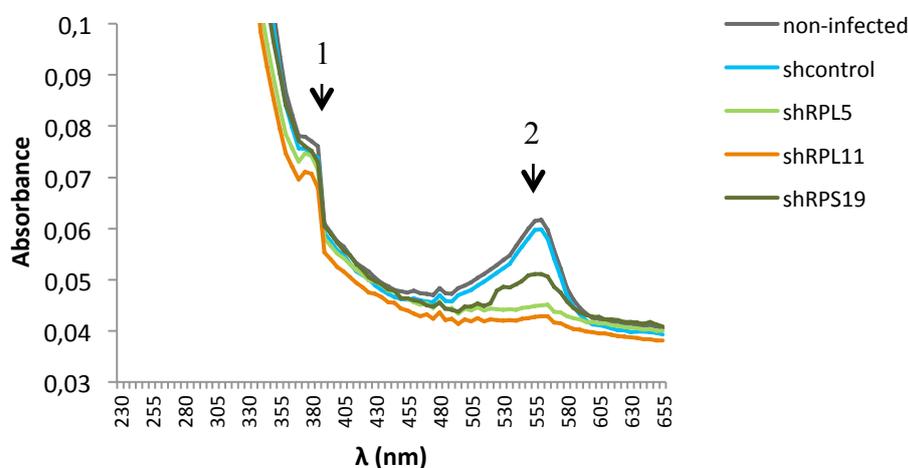


Figure 31. Retard d'hémoglobination dans les conditions shRPL5, shRPL11 et shRPS19 à J12. Dosage spectrophotométrique de 100 000 cellules shcontrôle, shRPL5, shRPL11 et shRPS19 à J12 (Pic 1) Bande de Soret (Pic 2) Hémoglobine.

Nous avons confirmé l'excès d'hème libre dans les conditions shRPL5, shRPL11 et shRPS19 par d'autres indicateurs. Plusieurs protéines sont régulées par l'hème libre qui a un rôle effecteur dans les érythroblastes (voir Introduction). L'augmentation d'hème libre dans les conditions shRPL5 et shRPL11 est confirmée par une augmentation de l'expression de l'exporteur d'hème FLVCR1 et une diminution très importante de l'expression du facteur de transcription Bach1 dans ces conditions en comparaison du contrôle (**Figure 32A**). D'autre part, le défaut d'hémoglobination mis en évidence par spectrophotométrie pour les conditions shRPL5 et shRPL11 est confirmé par immuno-buvardage. On observe un défaut majeur d'expression protéique des globines α et β pour ces conditions (80 à 100% moins

exprimées par rapport au shcontrôle en fonction du pourcentage d'inhibition de RPL5 et RPL11).

L'inhibition de l'expression des globines est aussi transcriptionnelle (**Figure 32C**). Ici encore le caractère intermédiaire du phénotype des cellules shRPS19 *in vitro* est confirmé par une expression légèrement augmentée de FLVCR1 dans cette condition ainsi qu'une expression protéique des globines diminuée de moitié par rapport au contrôle (**Figure 32A**) et une diminution de 30 à 50% des transcrits (**Figure 32C**). L'augmentation d'expression de FLVCR1 pour les conditions shRPL5, shRPL11 et shRPS19 est confirmée par cytométrie de flux (**Figure 32B**).

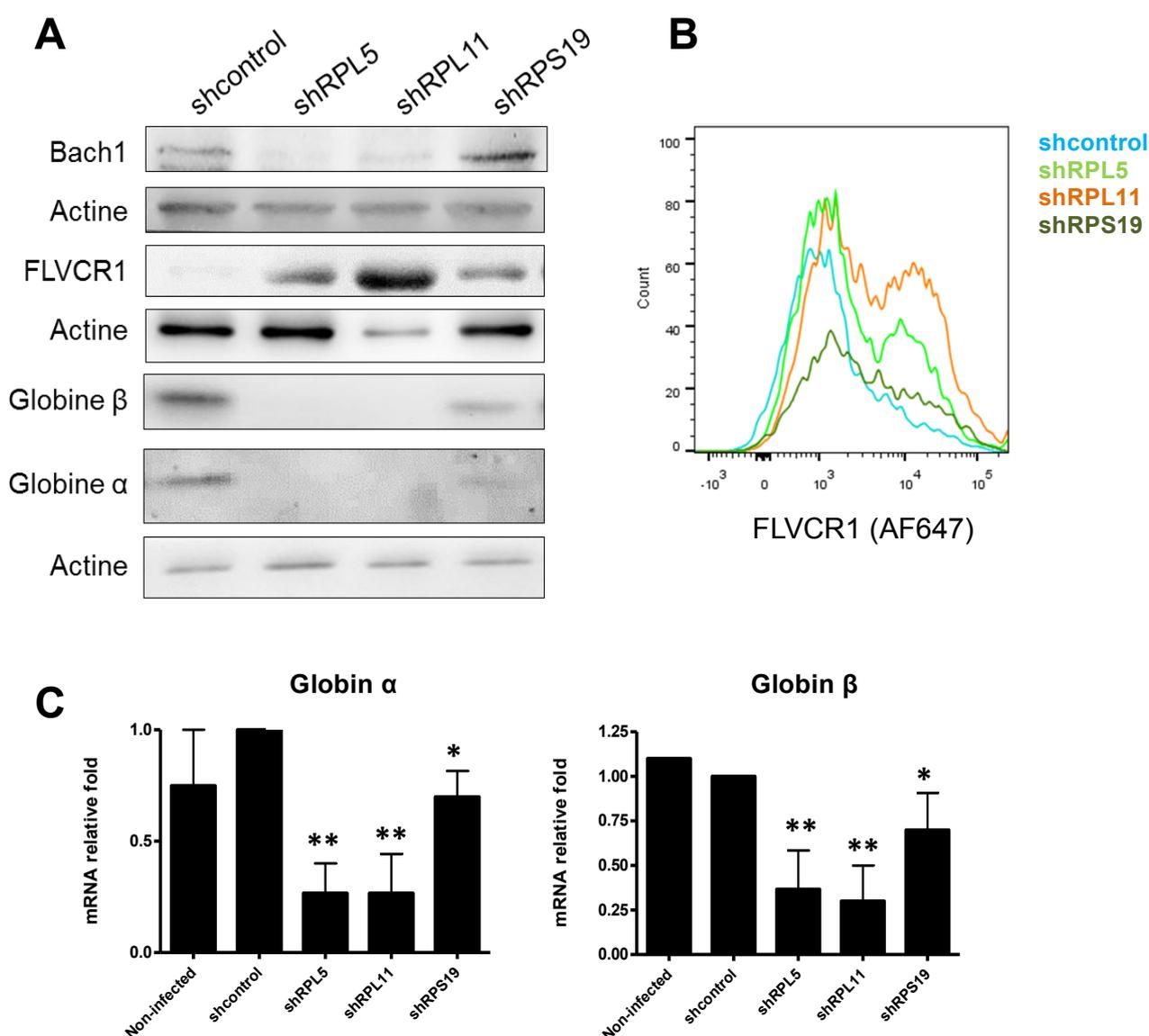


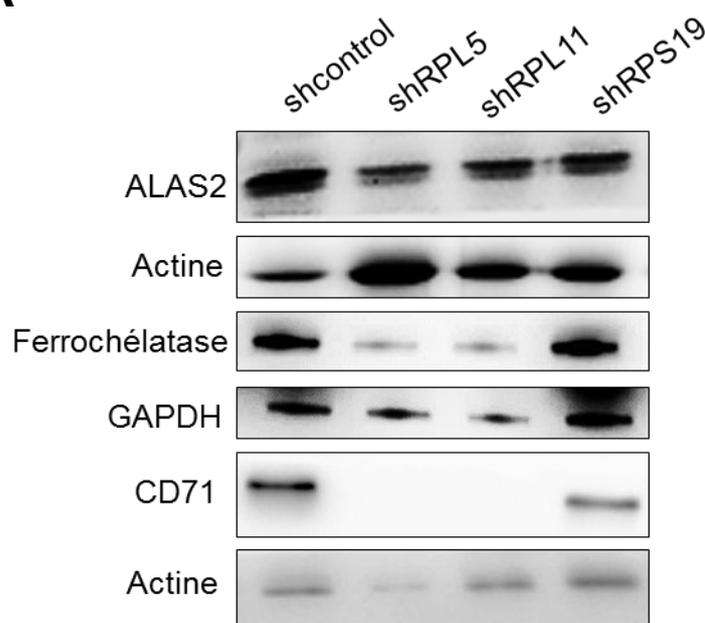
Figure 32. Surcharge en hème libre et défaut d'hémoglobinisation dans les conditions shRPL5, shRPL11 et shRPS19 à J9. **A/** Expression protéique de FLVCR1, Bach1 et des globines α et β dans des cellules shRPL5, shRPL11, shRPS19 et shcontrôle. **B/** Expression protéique de FLVCR1 mise en évidence par cytométrie de flux. **C/** Expression transcriptionnelle des globines α et β dans des cellules shRPL5, shRPL11, shRPS19 et

shcontrôle à J9. Normalisation par rapport à l'expression de l'actine β . *= $P < 0,05$; **= $P < 0,01$

C/ La synthèse d'hème est diminuée dans l'ABD

Pour comprendre pourquoi la quantité d'hème totale est diminuée dans les conditions shRPL5, shRPL11 et shRPS19, nous avons étudié l'expression d'ALAS2, de la ferrochélatase et du récepteur à la transferrine CD71 (Tfr1) dans ces cellules (**Figures 33A et B**). Le niveau d'expression de l'ALAS2 et de la ferrochélatase est diminué au niveau transcriptionnel et protéique dans les trois conditions shRPs. La quantité réduite d'hème total dans ces cellules est donc due à une diminution de la synthèse d'hème. D'autre part, l'import de fer par ces cellules est également réduite. Cela est mis en évidence par une diminution de l'expression protéique et transcriptionnelle de CD71 et une diminution transcriptionnelle de DMT1 (forme IRE-dépendante) (**Figures 33A et B**). Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de déficit de fer dans ces cellules : si c'était le cas, CD71 et DMT1 qui sont régulées par le système IRE/IRP seraient surexprimées. La synthèse d'hème étant diminuée, la cellule a moins besoin d'importer du fer.

A



Normalisation du signal par rapport à la protéine de ménage				
Protéine	shcontrôle	shRPL5	shRPL11	shRPS19
ALAS2	1	0,33	0,42	0,53
Ferrochélatase	1	0,47	0,55	0,84
CD71	1	0	0	0,49

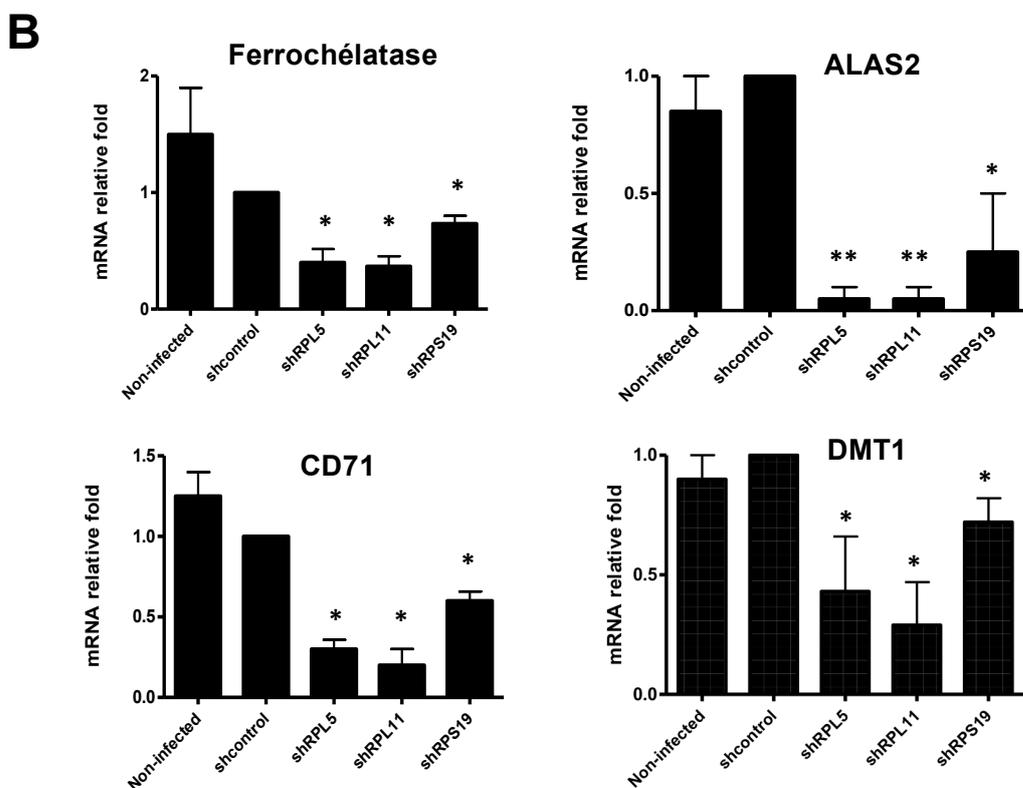


Figure 33. La synthèse d'hème et l'import de fer sont réduits dans les conditions shRPL5, shRPL11 et shRPS19 à J9. **A/** Expression protéique d'ALAS2, de la ferrochelatase et du récepteur à la transferrine (CD71) dans des cellules shRPL5, shRPL11, shRPS19 et shcontrôle. Normalisation par rapport à la protéine de ménage. **B/** Expression transcriptionnelle d'ALAS2, de la ferrochelatase, du récepteur à la transferrine (CD71), et de DMT1 (forme IRE-dépendante) dans des cellules shRPL5, shRPL11, shRPS19 et shcontrôle à J9 par rapport à l'actine β . *= $P < 0,05$; **= $P < 0,01$

D/ Etude de la traduction dans l'ABD

Pour étudier la traduction dans l'ABD, nous avons analysé l'expression des protéines EIF2 α et p-EIF2 α ainsi que l'expression de la protéine HRI qui est régulée par l'hème. HRI est moins exprimée et est hypophosphorylée dans les conditions shRPL5 et shRPL11 (**Figure 34A**). L'hypophosphorylation de HRI favorise la forme non-phosphorylée de EIF2 α , ce qui conduit à une activation de la traduction. De plus, p-EIF2 α n'est pas surexprimée dans les conditions shRPs, ce qui indique que la traduction n'est pas directement inhibée. Cependant, la quantité protéique totale EIF2 α + p-EIF2 α est réduite de façon importante dans les conditions shRPL5 et shRPL11 et moindre pour la condition shRPS19. L'expression de ces protéines est corrélée à leurs profils transcriptionnels (**Figure 34B**). On peut donc conclure que bien qu'il y ait une activation de la traduction par l'hème (p-EIF2 α n'est pas surexprimée et HRI est hypophosphorylée), la traduction est diminuée ou ralentie car les expressions de HRI et EIF2 α sont diminuées dans les conditions shRPL5, shRPL11 et shRPS19 par rapport au shcontrôle.

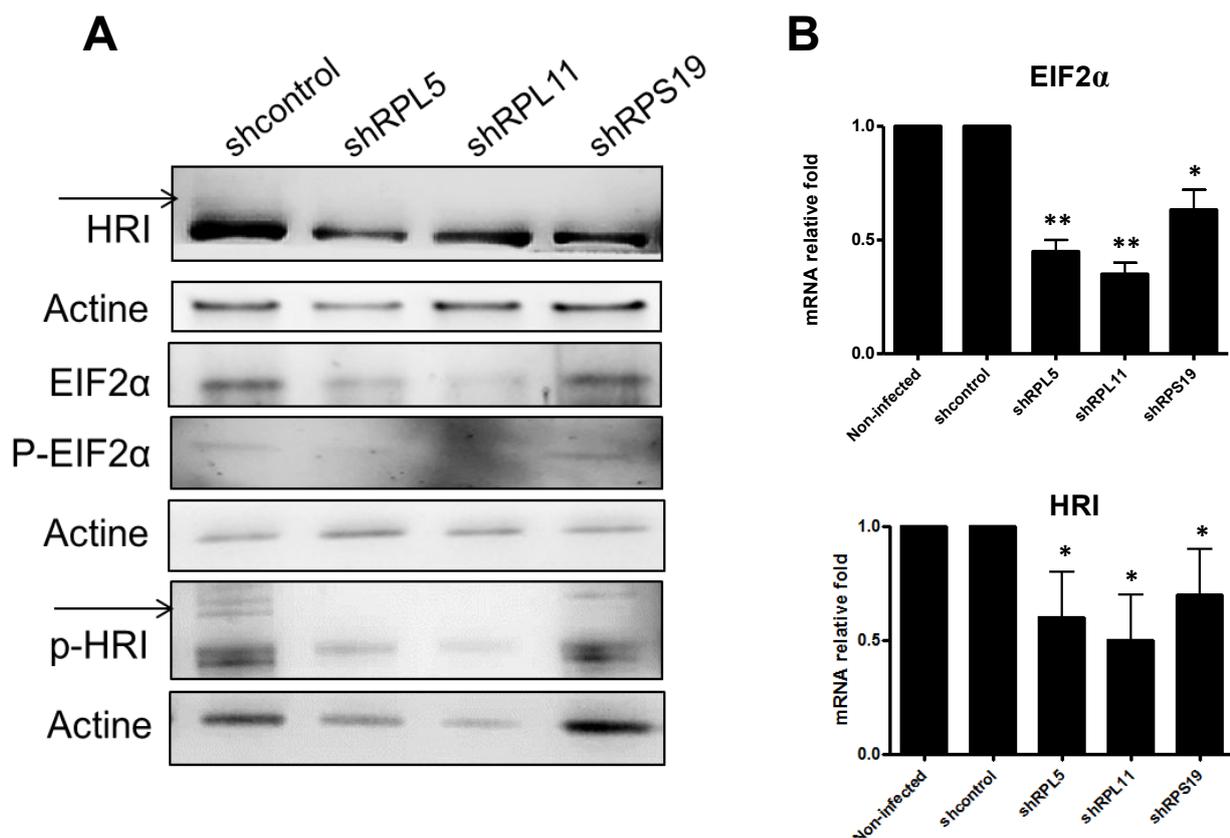


Figure 34. La traduction est activée mais réduite dans les conditions shRPL5, shRPL11 et shRPS19 à J9. A/ Expression protéique de HRI (la flèche montre les formes phosphorylées), EIF2 α et p-EIF2 α dans des cellules shRPL5, shRPL11, shRPS19 et shcontrôle. B/ Expression transcriptionnelle de EIF2 α et de HRI dans des cellules shRPL5, shRPL11, shRPS19 et shcontrôle à J9 par rapport à l'actine β . *= $P < 0,05$; **= $P < 0,01$

E/ Mise en évidence d'un déficit de GATA-1 dans l'ABD

Nous avons mis en évidence une discordance entre les mécanismes intracellulaires régulés par l'hème qui tendent à une augmentation de la synthèse des chaînes de globines (dégradation de Bach1 et diminution de la phosphorylation de EIF2- α) et la diminution tant au niveau transcriptionnel que protéique de l'expression des globines. Ces résultats suggèrent que la synthèse des chaînes de globines est inhibée à un autre niveau de contrôle. L'inhibition transcriptionnelle des globines, de la ferrochélatase et de l'ALAS2 suggère une inhibition de GATA-1, qui est le facteur de transcription de ces gènes et qui est un acteur clé de l'induction de la différenciation érythroïde. En étudiant l'expression de GATA-1, nous avons montré une diminution de ses expressions protéique et transcriptionnelle dans les trois conditions shRPs au neuvième jour de culture (**Figure 35 A et B**). L'expression protéique et transcriptionnelle de GATA-1 est réduite de 70% en moyenne dans les conditions shRPL5 et shRPL11 et de 50% en moyenne dans la condition shRPS19.

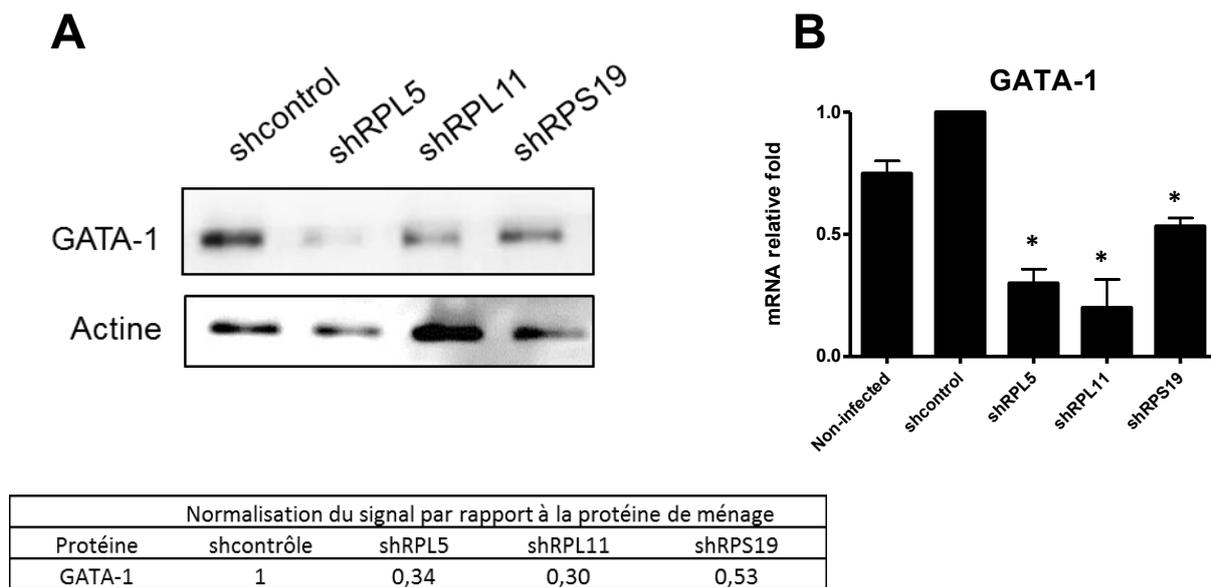


Figure 35. L'expression de GATA-1 est réduite dans les conditions shRPL5, shRPL11 et shRPS19. A/ Expression protéique de GATA-1 dans des cellules shRPL5, shRPL11, shRPS19 et shcontrôle. Normalisation par rapport à la protéine de ménage. B/ Expression transcriptionnelle de GATA-1 dans des cellules shRPL5, shRPL11, shRPS19 et shcontrôle par rapport à l'actine β . *= $P < 0,05$

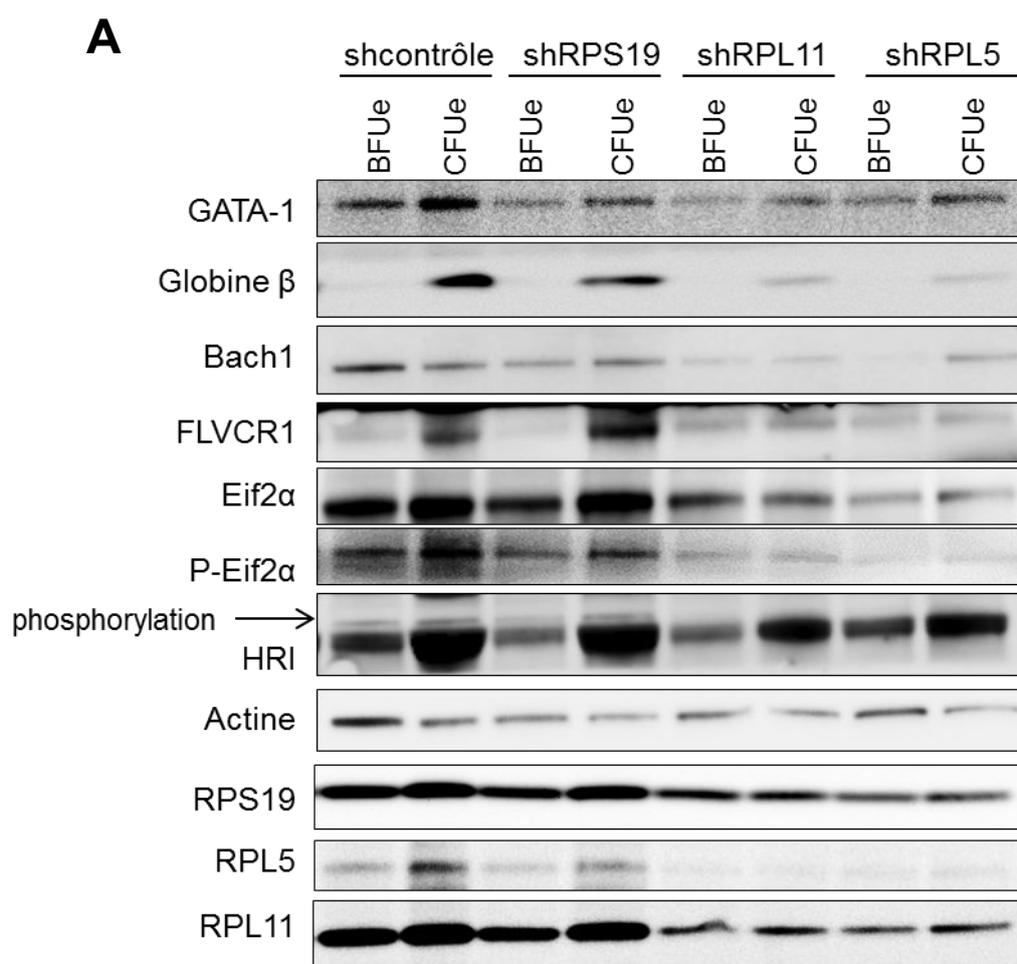
F/ Synchronisation des cellules du modèle shARN

Les résultats que nous avons mis en évidence précédemment auraient pu être dus à un retard de différenciation des cellules shRPL5 et shRPL11 que notre équipe avait déjà mis en évidence [213], qui a été mis en évidence par d'autres équipes (voir Introduction) et que nous avons confirmée (**Annexe 1 Figure supplémentaire 1**). Nous avons donc réalisé une expérience de synchronisation de ces cellules aux stades BFU-E et CFU-E, stades supposés du blocage au cours de l'ABD [219] qui correspondent dans nos conditions expérimentales au sixième jour de culture (**Figure 36**).

L'expérience de synchronisation montre que l'hémoglobinsation cellulaire commence au stade CFU-E (stade EPO-dépendant). D'autre part, l'expression protéique de GATA-1, EIF2 α , RPL5, RPL11, RPS19 et HRI augmente, ce qui traduit une activation de la traduction cellulaire cohérente avec le début de la synthèse de la globine β observée (**Figure 36 A et B**).

Au stade BFU-E, les cellules défectueuses en RPL5 et RPL11 sous-expriment Bach1 et surexpriment FLVCR1 par rapport au contrôle, signes d'une surcharge en hème libre (**Figures 36 A et B**). De plus, les résultats montrent une expression protéique de GATA-1, de la globine β , de Bach1 et de EIF2 α réduite pour les conditions shRPL5 et shRPL11 aux

stades BFU-E et CFU-E. Il existe donc un défaut intrinsèque d'hémoglobination et de maturation de ces cellules que nous démontrons ici et qui avait été suggéré par plusieurs équipes [271][275]. Les résultats que nous obtenons sur notre modèle shARN avec des cellules non-synchronisées ne sont donc pas entièrement dus au retard de différenciation car ils sont visibles sur des cellules synchronisées. D'autre part, p-EIF2 α n'est pas surexprimée dans les trois conditions. L'expression protéique de HRI et de EIF2 α est réduite et HRI est sous forme déphosphorylée dans les conditions shRPL5 et shRPL11. Nos résultats à J9 sont donc confirmés dans cette expérience de synchronisation cellulaire à J6.



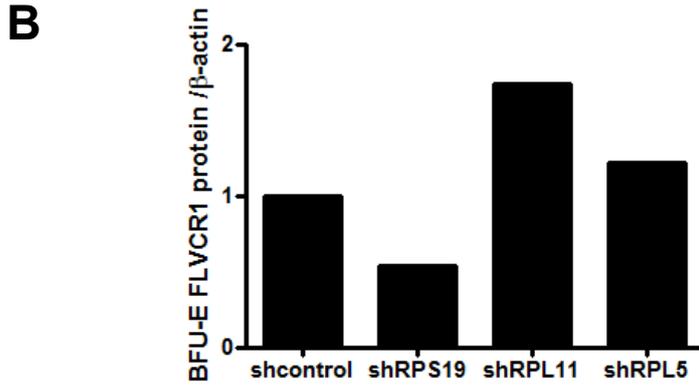


Figure 36. La synchronisation des cellules shRPs aux stades BFU-E et CFU-E à J6 montre un défaut intrinsèque des cellules conduisant à une érythropoïèse inefficace. A/ Expression protéique de GATA-1, globine β , Bach1, FLVCR1, EIF2 α , p-EIF2 α et HRI dans les conditions shRPL5, shRPL11, shRPS19 et shcontrôle aux stades BFU-E et CFU-E. **B/** Normalisation de l'expression protéique de FLVCR1 par rapport à l'actine pour les conditions shRPL5, shRPL11 et shRPS19 par rapport au shcontrôle au stade BFU-E.

II/ Etude de l'érythropoïèse dans des cellules primaires *in vitro*

Nous avons regardé si nous obtenions les mêmes résultats chez les patients atteints d'ABD que dans le modèle shARN. Les patients qui ont été étudiés sont répertoriés dans l'annexe 1 (**Tableau 4**). Des cultures primaires de CD34⁺ issues de sang périphérique de patients et de témoins ont été réalisées. Pour interpréter ces résultats, nous avons réalisé des cultures de CD34⁺ issues de sang de cordon et de sang périphérique sur 14 jours afin d'étudier les profils d'expression de nos protéines d'intérêt avec nos conditions de culture *in vitro*.

A/ Différenciation érythroïde de CD34⁺ non-infectées issues de sang de cordon *in vitro*

Les expériences de différenciation de CD34⁺ de sang de cordon nous ont permis de comprendre l'enchaînement des événements au cours de l'érythropoïèse avec notre protocole de culture. Ce sont des contrôles de différenciation pour nos expériences qui ne sont pas synchronisées aux différents stades de différenciation érythroïde. Le retard de différenciation étant une caractéristique de l'ABD, nous n'avons pas synchronisé les cellules de patients sur celles des témoins. Il aurait été intéressant de le faire à J6 pour confirmer les données obtenues avec le modèle shARN, mais la synchronisation cellulaire demande un grand nombre de cellules or nous n'avons que très peu de cellules chez les patients du fait d'une hypoprolifération caractéristique de l'ABD. Les expériences de différenciation

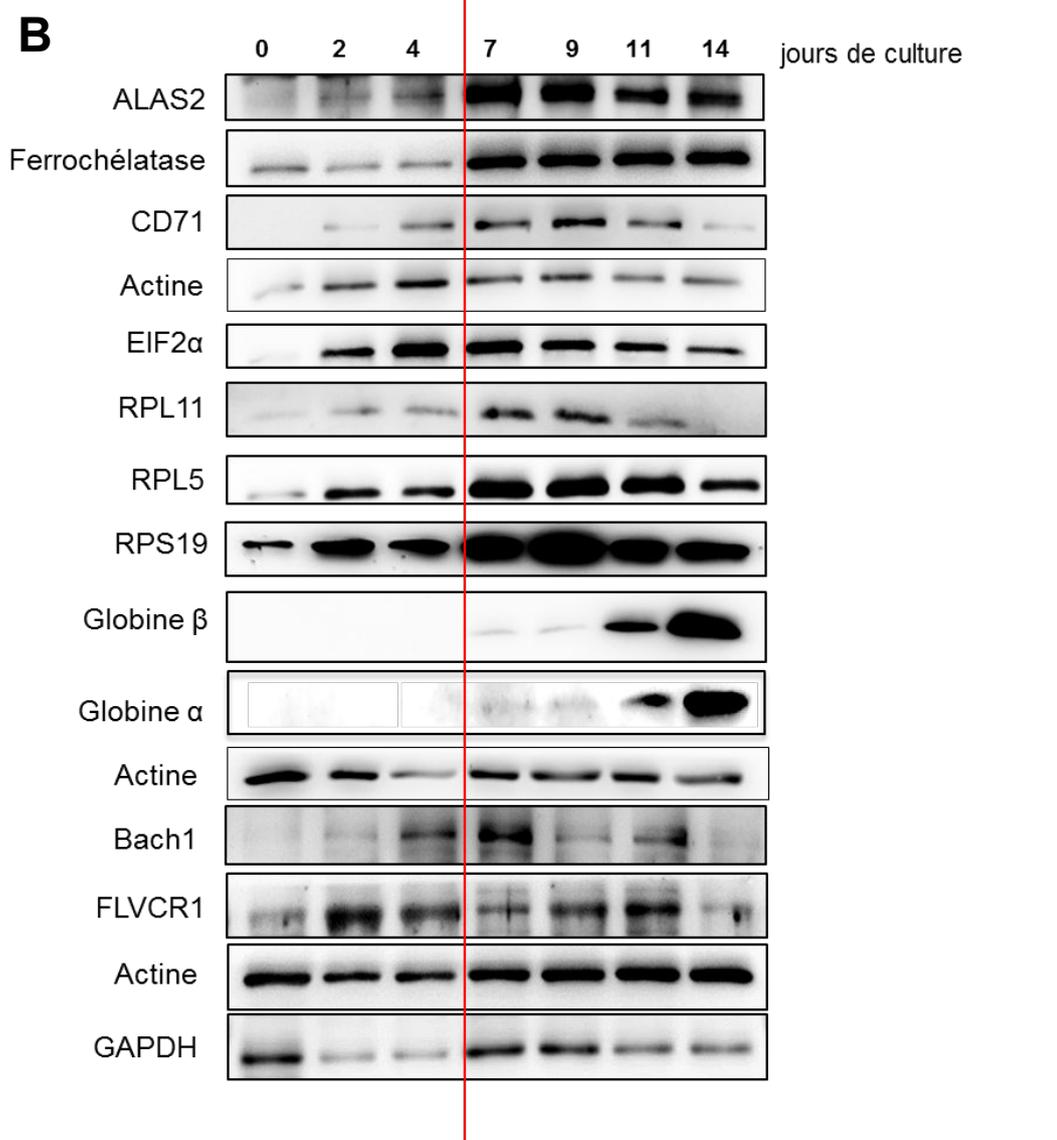
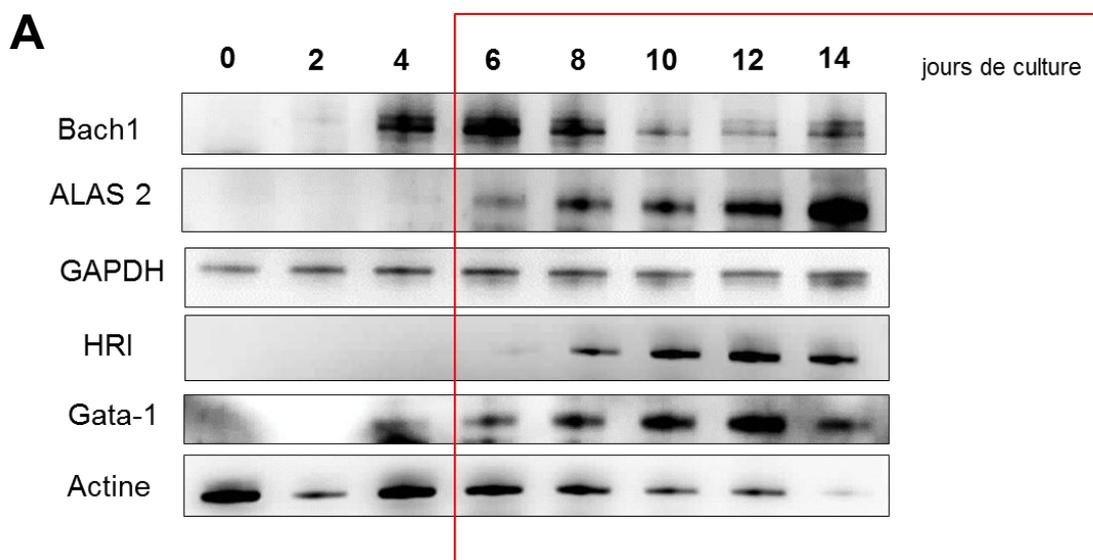
érythroïde de CD34⁺ issues de sang de cordon montrées sont représentatives de quatre expériences indépendantes réalisées dans deux milieux de culture différents. Il ne s'agit en aucun cas d'une étude exhaustive de l'érythropoïèse *in vitro*. Cela aurait nécessité un nombre d'expériences (n) plus important, et une synchronisation des cellules à chaque stade de différenciation en utilisant les marqueurs Band 3 et intégrine α_4 selon la technique développée par l'équipe de Narla Mohandas [16]. Il aurait fallu réaliser une analyse du transcriptome en parallèle et aussi du protéome pour éviter les biais liés à l'utilisation de la technique d'immuno-buvarbage.

A.1/ Immuno-buvardages

On observe deux phases distinctes en observant la figure 37 : une phase précoce de préparation à l'érythropoïèse de J1 à J6 et une phase tardive (cadre rouge), avec une érythropoïèse pleinement opérationnelle de J6 à J14 (**Figure 37A**). L'étape d'hémoglobinisation cellulaire et d'activation de la traduction vers J6 mise en évidence dans l'expérience de synchronisation est confirmée par ces expériences. Nous retrouvons une activation de la traduction suggérée par l'augmentation de l'expression protéique de EIF2 α et des protéines ribosomiques RPL5, RPL11 et RPS19 (**Figure 37B**). L'expression de HRI augmente au cours du temps (**Figure 37A**). L'expression de GATA-1 augmente à J6 et la synthèse des globines commence (**Figure 37A et B**). Comme attendu, la synthèse d'hème augmente au cours de la différenciation érythroïde. Ceci est suggéré par l'augmentation progressive des protéines ALAS2 et ferrochélatase (**Figure 37A et B**). L'import de fer dans la cellule *via* CD71 suit le profil de l'ALAS2 et augmente également pour assurer les besoins croissants de la cellule (**Figure 37B**). Tous ces mécanismes convergent pour produire l'hémoglobine.

Les profils protéiques de Bach1 et de FLVCR1 indiquent que la concentration d'hème libre dans la cellule fluctue même si la quantité d'hème totale au cours de l'érythropoïèse augmente (**Figure 37B**). Il semble y avoir plus d'hème libre en début de différenciation quand il y a une synthèse d'hème résiduelle mais pas encore de globines, et en fin de différenciation, quand la quantité d'hème est trop importante et que tout l'hème ne peut pas être incorporé aux globines. Bach1 est plus exprimé au moment où les globines commencent à être synthétisées à J6, au moment où l'hème synthétisé durant la phase précoce est incorporé aux globines naissantes et qu'il n'y a plus d'hème libre. L'expression de Bach1 diminue ensuite de J7 à J14 au fur et à mesure que la transcription des globines augmente, ce qui est consistant avec le rôle de répresseur transcriptionnel des globines de Bach1. Enfin, Bach1 et FLVCR1 ont des profils d'expression protéique opposés. Quand la

quantité d'hème libre est augmentée son export l'est aussi : FLVCR1 est surexprimée (**Figure 37B**). L'expression de HMOX1 a aussi été étudiée, mais nous avons trouvé que cette protéine est peu exprimée dans ces cellules, suggérant que les cellules érythroïdes exportent préférentiellement l'hème en excès plutôt que de le cataboliser confirmant ainsi les résultats trouvés par Alves et al. [172].



Normalisation du signal par rapport à la protéine de ménage								
Protéine	J0	J2	J4	J6	J8	J10	J12	J14
Bach1	0,0	1,0	1,9	2,8	2,4	1,8	2,0	2,1
ALAS2	0,0	0,0	1,0	8,2	13,6	18,1	32,9	40,8
HRI	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	3,5	3,5	7,0
Gata-1	0,0	0,0	1,0	1,0	1,6	4,1	5,1	10,4

Normalisation du signal par rapport à la protéine de ménage							
Protéine	J0	J2	J4	J7	J9	J12	J14
ALAS2	0,5	1,0	0,8	1,8	1,5	1,6	1,3
Ferrochélatase	1,2	1,0	1,1	4,5	3,5	3,3	3,6
CD71	0,0	1,0	4,7	10,6	14,7	13,1	1,5
EIF2 α	0,0	1,0	0,9	1,0	0,3	0,5	0,1
RPL11	0,1	1,0	1,2	1,7	1,6	1,5	0,9
RPL5	0,1	1,0	2,7	2,4	2,3	2,1	1,0
RPS19	0,2	1,0	1,8	0,7	0,8	0,5	0,8
Globine α	0,0	0,0	0,0	0,5	0,4	1,1	3,2
Globine β	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	1,6	4,0
Bach1	0,2	1,0	2,7	3,4	0,9	1,9	0,8
FLVCR1	0,2	1,0	0,8	0,4	0,5	0,6	0,2

Figure 37. Profils d'expression des protéines d'intérêt dans des CD34⁺ issues de sang de cordon en différenciation érythroïde *in vitro*. A/ Protéines ALAS2, Bach1, GATA-1 et HRI . B/ Protéines EIF2 α , RPL11, RPL5, RPS19, globines α et β , Bach1, FLVCR1, GATA-1, ALAS2, ferrochélatase et CD71.

A.2/ Analyse de la différenciation érythroïde *in vitro* par RT-PCRq

Pour vérifier si la différenciation érythroïde est identique entre des CD34⁺ issues de sang de cordon (modèle shARN) ou de sang périphérique (patients), nous avons réalisé deux cultures de CD34⁺ : une culture avec des CD34⁺ issues de sang de cordon et une culture avec des CD34⁺ issues de sang périphérique en parallèle sur 14 jours dans un même milieu en respectant la concentration cellulaire dans des puits de même dimension pour chaque expérience. Nous avons étudié l'expression des gènes codants pour l'ALAS2, la ferrochélatase, CD71, globines α et β (HBA et HBB), GATA-1, RPS19, RPL11, EIF2 α et HRI par RT-PCRq. Les profils transcriptionnels des gènes étudiés sont les mêmes pour des CD34⁺ extraites de sang de cordon ou de sang périphérique (**Figure 38**), seules les échelles de grandeur peuvent changer. Cette expérience montre qu'il n'y a pas de différence significative d'expression pour les gènes étudiés au cours de la différenciation érythroïde *in vitro* en fonction de la provenance des CD34⁺.

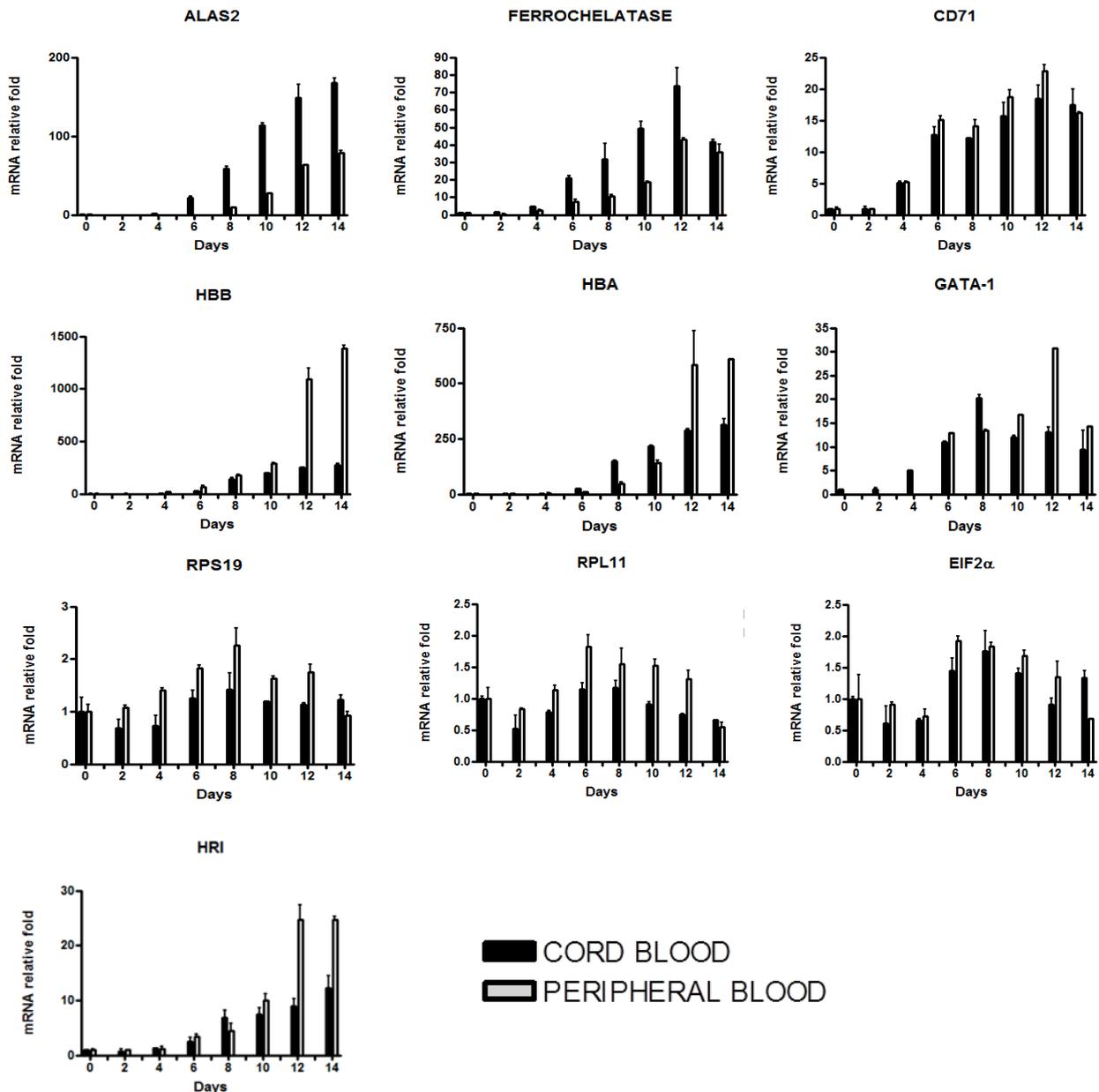


Figure 38. Comparaison transcriptionnelle des CD34⁺ issues de sang de cordon et de sang périphérique en différenciation érythroïde *in vitro* par RT-PCRq. Profils transcriptionnels des gènes de l'ALAS2, la ferrochélatase, CD71, des globines α et β (HBA et HBB), GATA-1, RPS19, RPL11, EIF2 α et HRI au cours de la différenciation érythroïde *in vitro* et normalisés par rapport à l'actine β .

D'autre part, on observe que la mortalité cellulaire des CD34⁺ issues de sang de cordon ou de sang périphérique varie au cours de la différenciation érythroïde. Elle est élevée en début et en fin de différenciation et diminue vers J6 (**Figure 39A**). Tandis que la prolifération cellulaire est maximale vers J6 et faible en début et en fin de culture (**Figure 39B**). Ainsi, vers J6, au moment où les cellules deviennent dépendantes à l'EPO, la prolifération cellulaire est augmentée tandis que l'apoptose est diminuée.

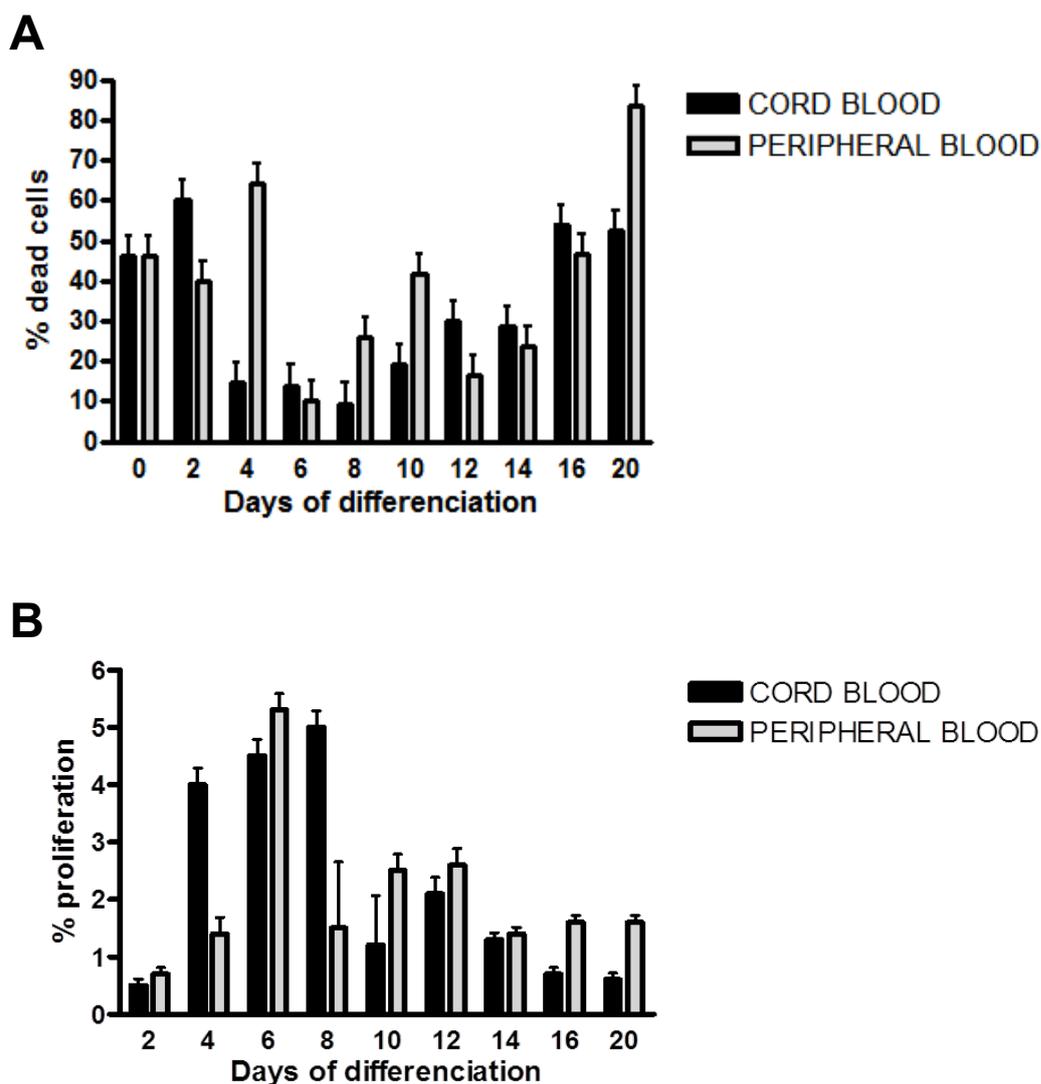


Figure 39. Mort cellulaire et prolifération dans des CD34⁺ issues de sang de cordon et de sang périphérique en différenciation érythroïde *in vitro*. A/ Mortalité cellulaire des CD34⁺ au cours de la différenciation érythroïde mise en évidence par coloration au bleu trypan 0,2%. B/ Prolifération cellulaire des CD34⁺ au cours de la différenciation érythroïde.

B/ Etude de l'érythropoïèse de patients atteints d'ABD *in vitro*

B.1/ Métabolisme du fer

Nous avons étudié le métabolisme du fer chez des patients atteints d'ABD. Les dosages d'hepcidine, du fer, de la transferrine et de la ferritine sériques ainsi que les calculs de capacité totale de liaison du fer (TIBC) et de saturation de la transferrine (TS) ont été réalisés par le Drs Thibaut Lefèbre et Caroline Schmitt au Centre Français des Porphyries du C.H.U. de Louis Mourier. Les résultats sont présentés dans le tableau 3. Cette étude a été réalisée sur une petite cohorte de dix patients qui inclus cinq patients transfusés et cinq patients non-transfusés ayant différentes mutations décrits dans l'annexe 1 (**Tableau 4**). Nous n'avons trouvé ni déficit ni surcharge en fer chez les patients non-transfusés. En effet, les

dosages de saturation de la transferrine et de ferritine sont dans les valeurs normales pour les patients non-transfusés indépendamment du sexe. D'autre part, la concentration sérique d'hepcidine est normale chez ces patients. Une surcharge en fer a été observée chez les patients transfusés. Nous avons trouvé une élévation de la concentration d'hepcidine, de la quantité de fer, de la saturation de la transferrine et de la ferritine sériques chez ces patients. Cette surcharge en fer était prévisible car secondaire aux transfusions sanguines. Quatre des cinq patients transfusés étudiés ont un traitement chélateur du fer. Les moyennes ont été réalisées sur une cohorte restreinte. Les critères du traitement et du sexe sont séparés mais le faible nombre de patients ne permet pas d'effectuer des statistiques par traitement/par sexe et par mutations qui aient une significativité réelle. Nous confirmons cependant qu'il n'y pas de perturbations majeures du métabolisme du fer chez les patients atteints d'ABD, en particulier pas de surcharge en fer significative en l'absence de transfusion.

B.2/ EPO et hémopexine

Des dosages EPO et hémopexine (HPX) ont été réalisés par ELISA sur des plasmas de patients. Les patients atteints d'ABD ont un niveau d'EPO augmentée par rapport aux contrôles (**Figure 40A**). Ce résultat confirme les résultats déjà publiés par d'autres équipes (voir Introduction). Les concentrations élevées d'EPO confirment l'anémie et montrent qu'il n'y a pas d'altération de la synthèse d'EPO chez les patients. D'autre part, les dosages d'hémopexine montrent une hémopexine plus élevée chez les patients en moyenne, ce qui confirme là aussi l'anémie (**Figure 40B**). Les concentrations d'EPO et d'HPX auraient dû être plus faibles chez les patients transfusés que chez les patients non-transfusés. Cependant, les plasmas étant prélevés juste avant la transfusion, ceci explique que nos résultats ne reflètent pas le bénéfice de la transfusion sanguine sur l'anémie.

Patient ID	Hepcidine (ng.mL ⁻¹)	Fer (μmol.L ⁻¹)	Transferrine (g.L ⁻¹)	Capacité liaison fer totale (TIBC) (μmol.L ⁻¹)	Transferrine saturation (TS) (%)	Ferritine (μg.L ⁻¹)
DBA 590	55,5	36	1,34	34	> 100	1920
DBA 591	113,2	59	2,13	53	>100	4783
DBA 1102	95,9	51	2,1	53	97	832
DBA 35	74,2	42	1,4	35	>100	1211
DBA 390	9,9	24	2,26	56	42	75
DBA 631 (IT)	13,4	19	2,15	54	35	56
DBA 826	50,2	23	1,92	48	48	572
DBA 892	67	56	2,12	53	>100	2279
DBA 905	2,7	22	2,18	55	40	64
DBA 597	2,8	29	1,66	42	70	384
Moyenne transfusés	81,16 F:75 M:90	48,8 F:43 M:58	1,7425 F:2 M:2	45,6 F:41 M:53	99,4 F:99 M:100	2205 F:1321 M:3531
Moyenne Non-transfusés	15,8 F:8 M:21	23,4 F:21 M:25	2,034 F:2 M:2	51 F:55 M:49	47 F:38 M:53	230,2 F:60 M:344
Valeurs normales	1 -20 ng/mL	F: 10-26 μmol/L H: 12-26 μmol/L	2 - 4 g/L	45-66 μmol/L	F: 15- 35% H: 20-40 %	F: 3-105 μg/L H: 5-250 μg/L

Tableau 3 : Bilans martiaux des patients atteints d'ABD et dosage d'hepcidine. Patients transfusés en rose clair et patients non-transfusés en rose foncé. F : femme ; M : homme. Mutations génétiques répertoriées dans tableau des patients (voir Tableau 4).

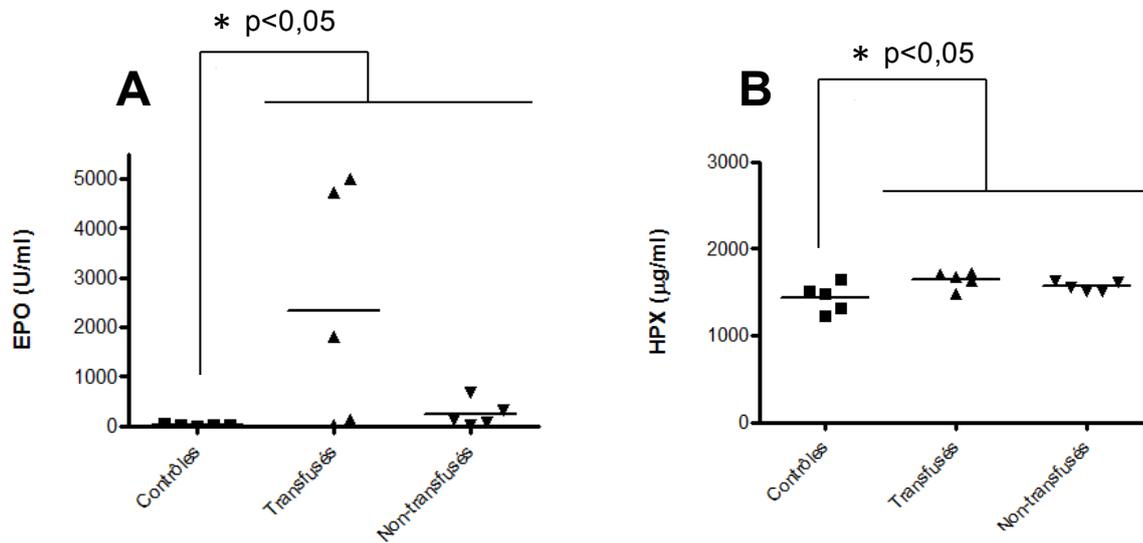


Figure 40. Dosages d'EPO et d'hémopexine chez les patients atteints d'ABD. A/ Concentration d'EPO (en UI/ml) chez des contrôles et des patients transfusés ou non-transfusés. B/ Concentration d'HPX (en µg/ml) chez des contrôles et des patients transfusés ou non-transfusés. *= $P < 0,05$; **= $P < 0,01$

B.3/ Différenciation *in vitro* : confirmation des phénotypes observés dans le modèle shARN chez les patients atteints d'ABD.

B.3.1/ Production de FRO

A J9, nous montrons une production de FRO chez les patients (**Figure 41**). Il y a moins de FRO produits chez les patients mutés pour le gène *RPS19* ($RPS19^{mut/+}$) que pour les mutations du gène *RPL5* ou d'autres mutations ($RPS19^{+/+}$) conformément au résultat obtenu grâce au modèle shARN.

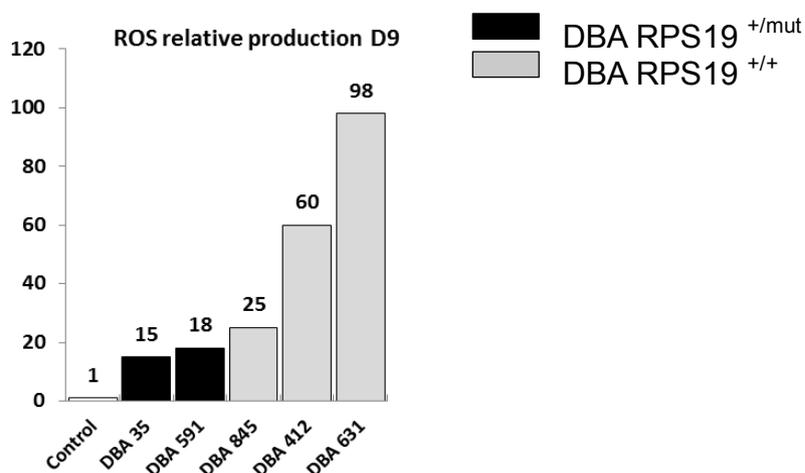


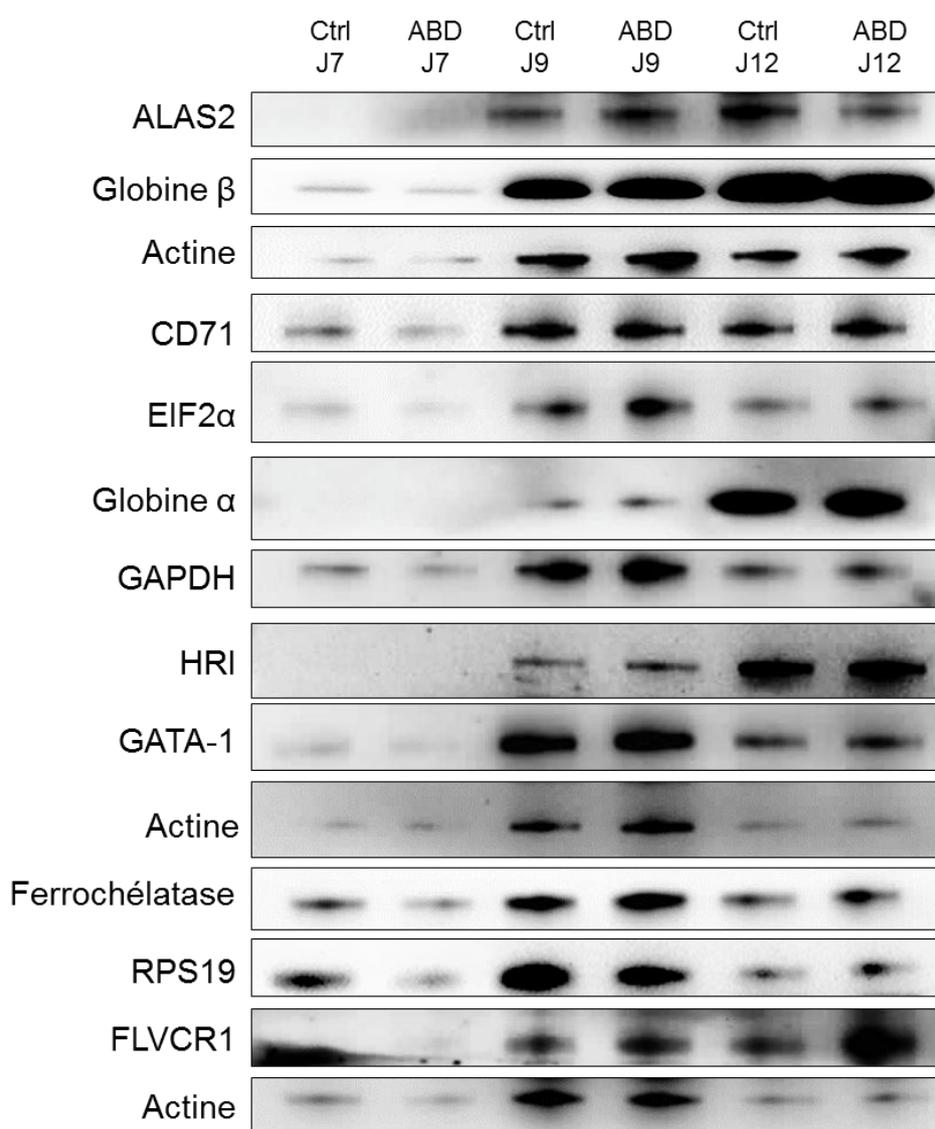
Figure 41. Production de FRO chez les patients atteints d'ABD à J9. Patients mutés pour le gène *RPS19* en noir et patients ayant d'autres mutations en gris clair.

B.3.2/ Le retard de différenciation érythroïde est très modéré chez les patients

RPS19^{mut/+}

Nous avons étudié la différenciation érythroïde *in vitro* de cellules CD34⁺ périphériques de trois patients porteurs d'une mutation dans le gène *RPS19*. Les trois patients sont transfusés. Chez les trois patients étudiés, on observe une synthèse de globines légèrement retardée (**Figures 42, 43 et 44**). L'expression transcriptionnelle des globines est normale ou faiblement diminuée (**Figure 45**). L'expression protéique et transcriptionnelle d'ALAS2, de la ferrochélatase, de HRI, de EIF2 α et de CD71 sont normales ou légèrement diminuées selon le jour de culture (**Figures 42, 43 et 45**). Au niveau transcriptionnel, RPS19 est moins exprimée (**Figure 45**) et on observe une diminution de l'expression protéique de RPS19 chez les patients ABD35 et ABD826. Cette diminution protéique par rapport au contrôle est de 50% en moyenne. Il ne semble pas y avoir de surcharge en hème libre chez ces patients (expression de Bach1 normale) ou très légère (on voit une augmentation de l'expression de FLVCR1 chez le patient ABD35 en fin de différenciation et chez le patient ABD826 à J7 qui s'explique par une expression des globines diminuée). L'expression protéique de GATA-1 est normale chez le patient ABD35 (**Figure 42**) et diminuée de moitié chez le patient ABD826 à J7 (**Figure 43**). La diminution de GATA-1 est visible sur l'expression d'ALAS2 et de la globine β chez ce patient à J7. Le phénotype observé est un peu moins sévère chez les patients que pour la condition shRPS19 à J9. Cependant, l'inhibition transcriptionnelle de RPS19 est de 60% à J9 dans le modèle shARN et 50% chez les patients. Pour conclure, les patients ayant une mutation du gène *RPS19* ont une érythropoïèse peu retardée *in vitro*, une accumulation d'hème libre faible et transitoire et produisent peu de FRO.

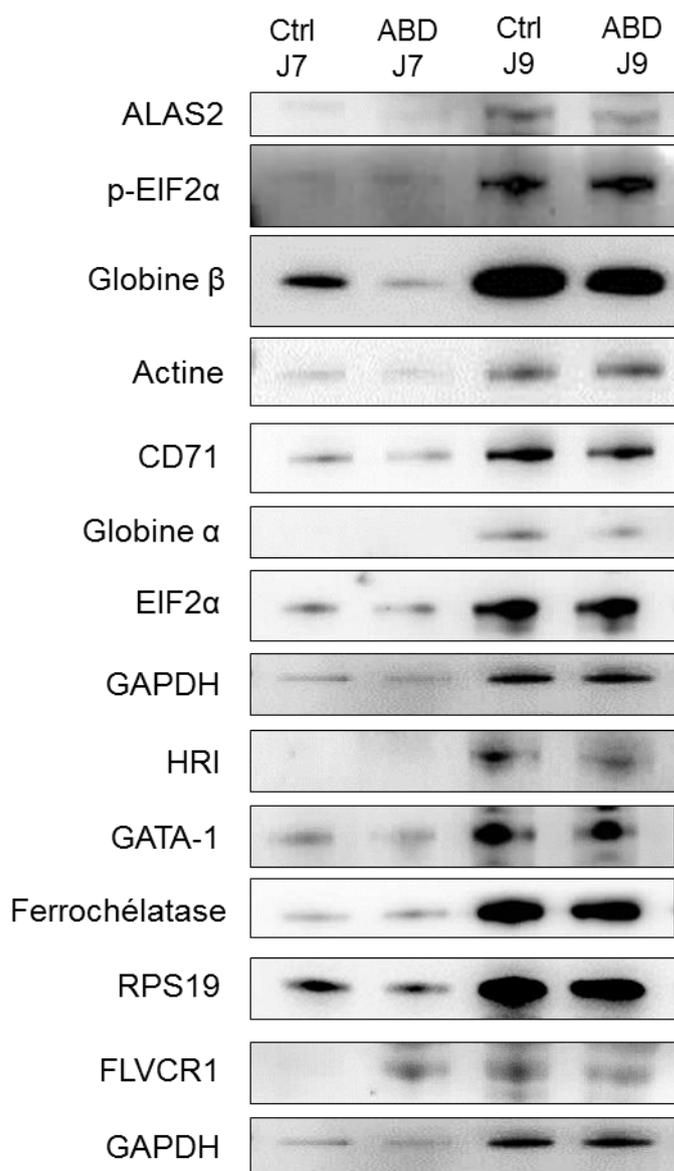
Patient ABD35



Normalisation du signal par rapport aux protéines de ménage						
Protéine	Ctrl J7	ABD35 J7	Ctrl J9	ABD35 J9	Ctrl J12	ABD35 J12
GATA-1	1	1	1,81	1,81	4	3,54
ALAS2			1	1,23	1,88	1,01
HRI			1	1,05	5,98	4,37
Globine α			1	0,63	4,45	4,13
Globine β	1	0,69	1,8	1,74	4,08	3,17
Ferrochelatase	1	0,62	1,57	1,47	1,79	1,65
RPS19	1	0,50	1,23	0,79	1,52	0,98
EIF2α	1	0,60	1,19	1,41	1,78	1,65
CD71	1	0,49	0,95	0,91	1,27	1,25
FLVCR1			1	1,53	5,25	15,25

Figure 42. Différenciation érythroïde du patient ABD35 (mutation RPS19) *in vitro*. Expression protéique d'ALAS2, de la ferrochelatase, de GATA-1, de CD71, des globines α et β, de HRI, FLVCR1, EIF2α et RPS19. Normalisation par rapport aux protéines de ménage. ABD : patient; Ctrl : témoin contrôle.

Patient ABD826



Normalisation du signal par rapport aux protéines de ménage				
Protéine	ctrl J7	ABD826 J7	ctrl J9	ABD826 J9
GATA-1	1	0,52	1,35	1,27
ALAS2	1		3,16	1,74
HRI			1	0,84
Globine α			1	0,65
Globine β	1	0,38	1,37	0,88
Ferrochélatase	1	0,61	3,46	3,62
RPS19	1	0,43	1,46	1,27
EIF2α	1	0,84	2,58	2,26
CD71	1	0,57	1,76	1,33
FLVCR1		1	1,11	0,82
p-EIF2α	1	1,04	0,5	0,41

Figure 43. Différenciation érythroïde du patient ABD826 (mutation RPS19) *in vitro*. Expression protéique d'ALAS2, de la ferrochélatase, de GATA-1, de CD71, des globines α et β, de HRI, FLVCR1, EIF2α et RPS19. Normalisation par rapport aux protéines de ménage. ABD : patient; Ctrl : témoin contrôle.

Patient ABD591

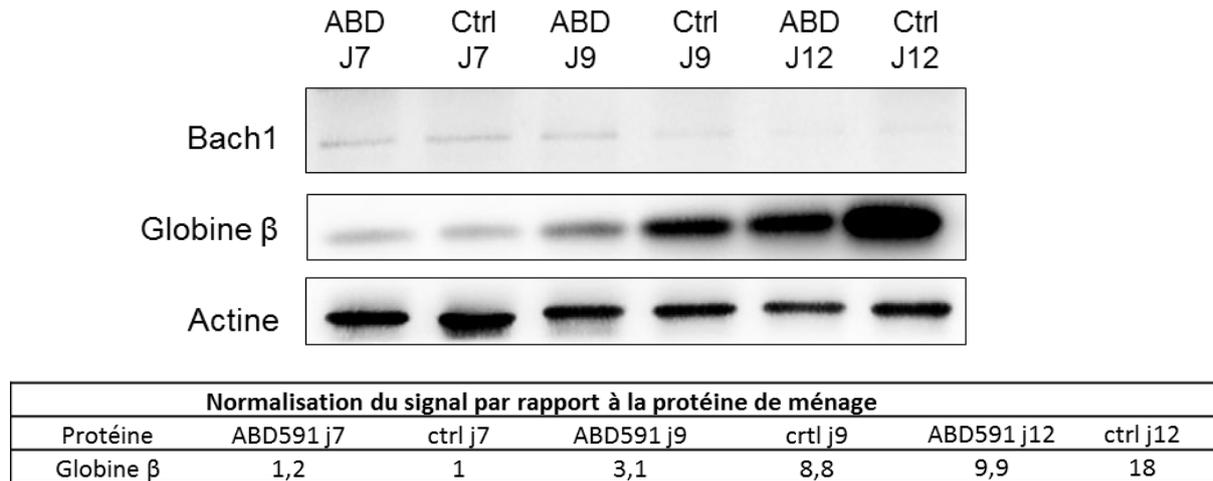


Figure 44. Différenciation érythroïde du patient ABD591 (mutation RPS19) *in vitro*. Expression protéique de Bach1 et de la globine β. Normalisation par rapport aux protéines de ménage. ABD : patient; Ctrl : témoin contrôle.

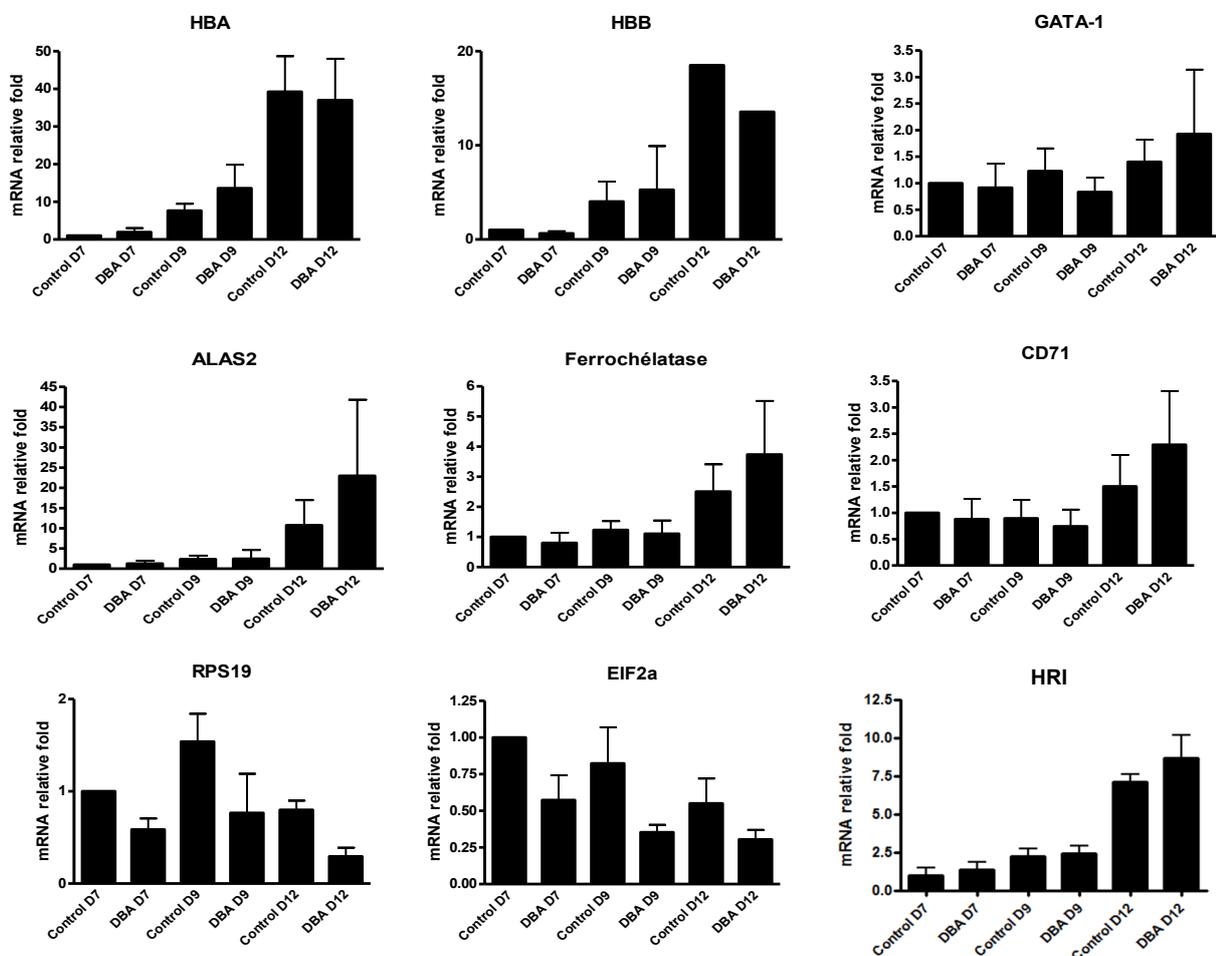
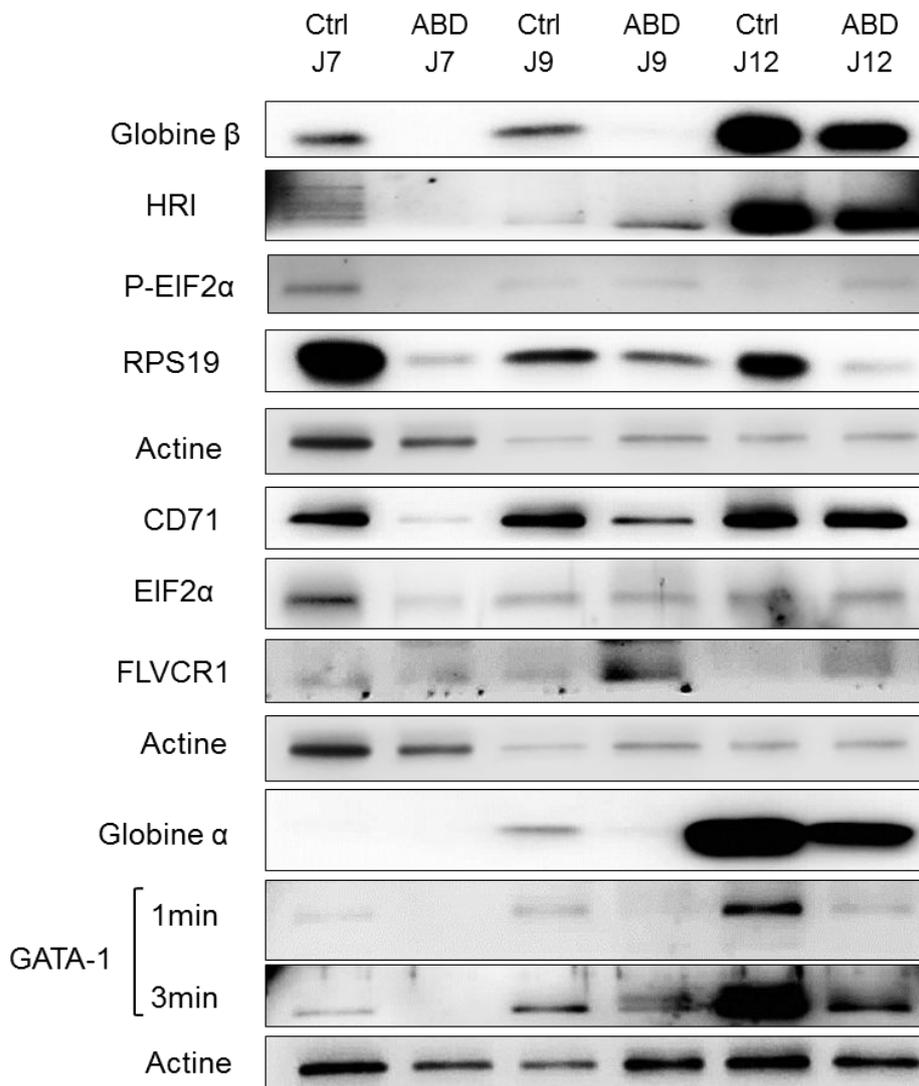


Figure 45. Profils transcriptionnels des globines α et β (HBA et HBB), GATA-1, ALAS2, ferrochelatase, CD71, RPS19, EIF2α et HRI au cours de la différenciation érythroïde *in vitro* chez le patient ABD35 muté pour le gène RPS19. DBA: patient; Control: témoin contrôle. Gène rapporteur : actine β

B.3.3/ La différenciation érythroïde est retardée chez les patients atteints d'ABD porteurs de mutations dans un gène RP autre que *RPS19*, *RPS19*^{+/+}

Les patients *RPS19*^{+/+} ont un retard de différenciation visible par immuno-buvarpage et RT-PCRq (Figures 46, 47, 48, 49 et 50). Cinq patients sont présentés dont trois porteurs de mutations dans le gène *RPL5* (ABD411, ABD412 et ABD845) et un patient muté pour le gène *RPL11* (ABD1099). Seul le patient ABD1099 est transfusé. La figure 46 montre que l'expression des globines α et β commence après J9 chez le patient ABD1099, et qu'à J12, l'hémoglobinisation des cellules est moindre. La traduction n'est pas inhibée chez le patient (sauf à J12) car la forme phosphorylée de EIF2 α n'est pas surexprimée mais elle est ralentie à J7 (expression de EIF2 α diminuée). L'import de fer (CD71) chez ABD1099 est diminué mais augmente au cours du temps. FLVCR1 est surexprimé chez le patient à J7, J9 et J12, indiquant une quantité d'hème libre consécutive au défaut d'hémoglobinisation augmentée. D'autre part, l'expression de GATA-1 chez le patient est diminuée mais augmente au cours du temps avec un retard, en accord avec le profil d'expression des globines.



Normalisation du signal par rapport aux protéines de ménage						
Protéine	Ctrl J7	ABD1099 J7	Ctrl J9	ABD1099 J9	Ctrl J12	ABD1099 J12
GATA-1	1	0	5,5	3,2	14,9	6,3
p-EIF2 α	1	0	0,68	0,43	0,54	1,6
HRI			1	0,54	2,42	2,32
Globine α			1	0	3,28	1,8
Globine β	1	0	13,61	0	23,05	16,75
RPS19	1	0,06	3,98	0,62	2,73	0,28
EIF2 α	1	0,21	3,66	1,78	4,92	1,62
CD71	1	0,02	12,2	1	6,17	5,19
FLVCR1	1	20,74	60,77	125,67	8,34	59

Figure 46. Différenciation érythroïde *in vitro* chez le patient ABD1099 (mutation RPL11). Expression protéique de GATA-1, de CD71, des globines α et β , de HRI, FLVCR1, EIF2 α , p-EIF2 α et RPS19. Normalisation par rapport aux protéines de ménage. ABD : patient; Ctrl : témoin contrôle.

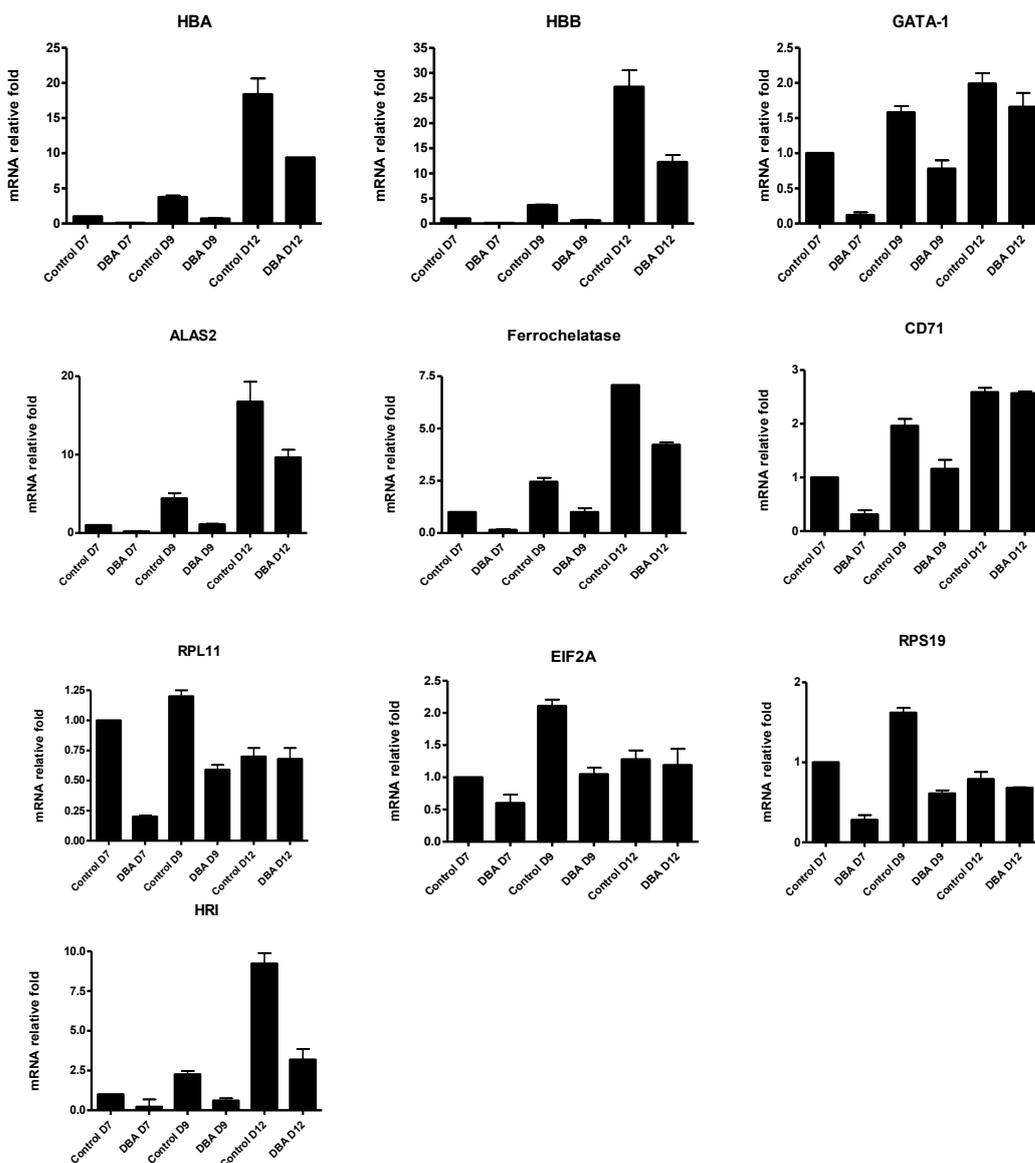


Figure 47. Profils transcriptionnels des globines α et β (HBA et HBB), GATA-1, ALAS2, ferrochélatase, CD71, RPL11, RPS19, EIF2 α et HRI au cours de la différenciation érythroïde *in vitro* du patient ABD1099 (mutation RPL11). Gène rapporteur : actine β

D'un point de vue transcriptionnel, le retard de différenciation chez le patient ABD1099 est confirmé par l'expression réduite des globines, de GATA-1, de l'ALAS2, de la ferrochélatase, de CD71 et de HRI par rapport au contrôle chaque jour de la cinétique (**Figure 47**). La différenciation érythroïde se déroule normalement (les profils d'expression transcriptionnelles étudiées ont une allure normale) mais est très retardée chez le patient ABD1099 muté pour le gène *RPL11* en accord avec les résultats trouvés dans la condition shRPL11 du modèle shARN. Les ordres de grandeur changent mais l'allure des profils transcriptionnels des globines α et β , de l'ALAS2, de CD71 et de la ferrochélatase qui sont tous des gènes cibles de GATA-1 sont semblables. D'autre part, on observe que les profils transcriptionnels de EIF2 α , RPL11 et RPS19 se ressemblent également confirmant les résultats obtenus lors des expériences de différenciation de CD34⁺ non-infectées *in vitro* qui montrait que ces protéines de la traduction étaient régulées en même temps et avaient les mêmes profils traductionnels et transcriptionnels. Enfin, les valeurs d'amplification des globines, de l'ALAS2 et de la ferrochélatase sont élevées par rapport à d'autres gènes montrant que ces cellules ont pour rôle essentiel la synthèse de l'hémoglobine (**Figure 47**).

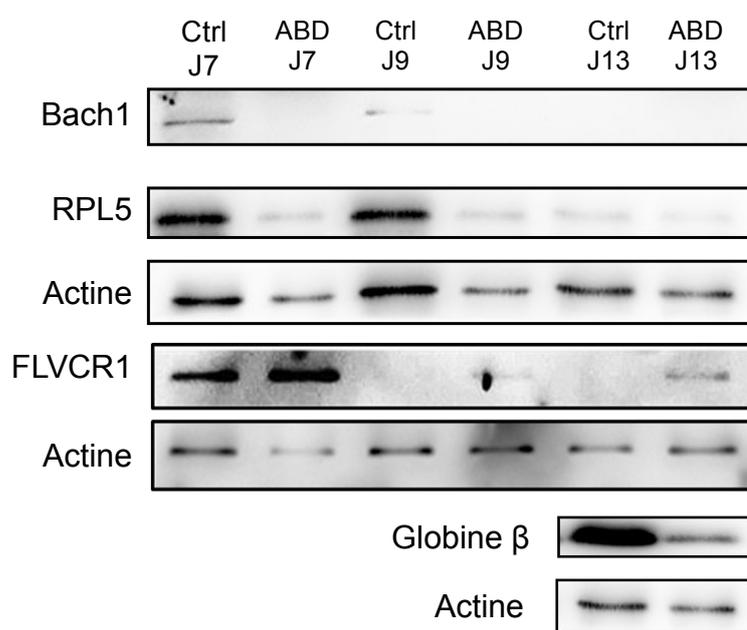


Figure 48. Différenciation érythroïde *in vitro* chez le patient ABD631 (mutation inconnue). Expression protéique de Bach1, de RPL5, de la globine β et de FLVCR1. ABD : patient; Ctrl : témoin contrôle.

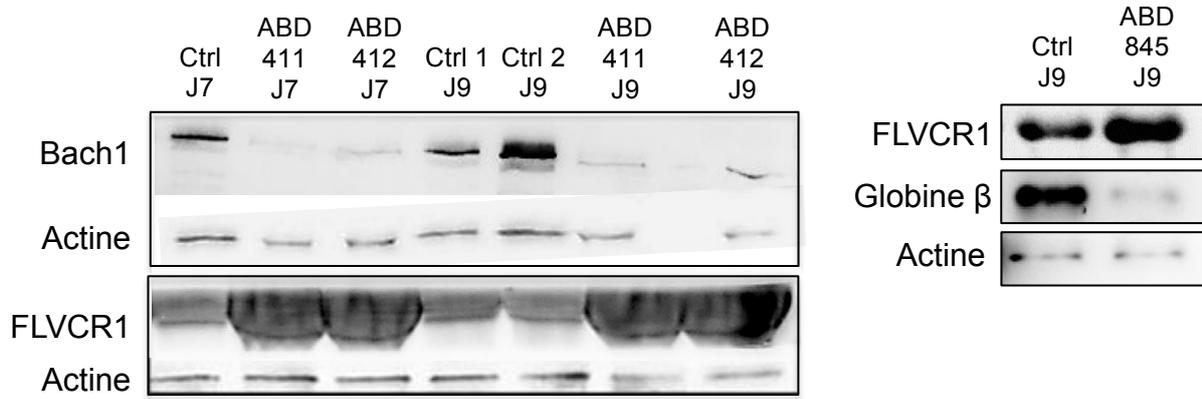


Figure 49. Accumulation d'hème libre chez les patients $RPL5^{mut/+}$. Expression protéique de Bach1, de la globine β et de FLVCR1. ABD : patient; Ctrl : témoin contrôle.

L'augmentation d'hème libre est bien visible chez les patients $RPS19^{+/+}$ (Figures 48 et 49). L'expression de Bach1 est très réduite chez ces patients (ABD631, ABD411 et 412). D'autre part, l'expression de FLVCR1 est augmentée chez les cinq patients à J9 dont trois patients porteurs de mutation du gène $RPL5$, $RPL5^{mut/+}$ (ABD411, ABD412 et ABD845) et un porteur d'une mutation du gène $RPL11$, $RPL11^{mut/+}$ (ADB1099). La synthèse de la globine β est fortement diminuée (ABD631 et ABD845). Le phénotype *in vitro* obtenu dans le modèle shARN pour shRPL5 est confirmé chez les patients $RPL5^{mut/+}$ (Figure 50).

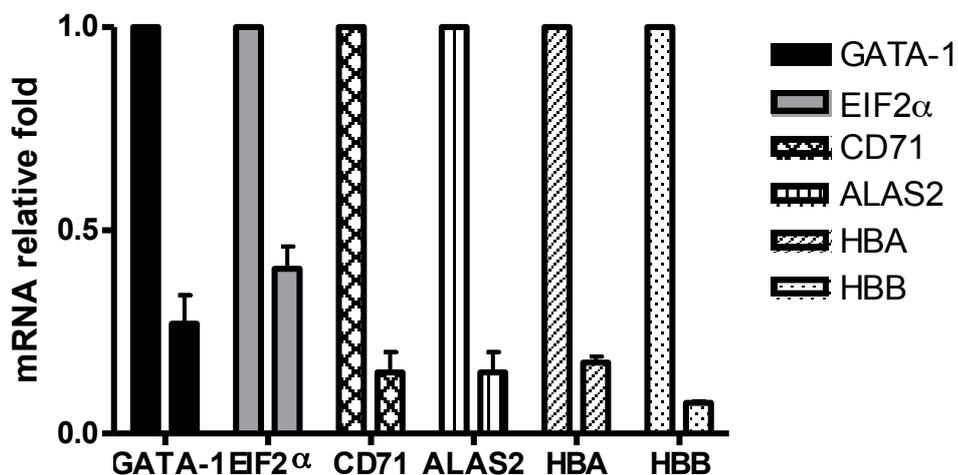


Figure 50. Expression transcriptionnelle réduite de GATA-1, EIF2 α , CD71, ALAS2, des globines α et β (HBA et HBB) chez un patient $RPL5^{mut/+}$. Témoin contrôle fixé arbitrairement à 1 pour chaque gène, patient 2^{ème} histogramme pour chaque gène. Gène rapporteur : actine β

Les patients ayant une mutation du gène *RPL5* ou du gène *RPL11* ont des profils transcriptionnels semblables à ceux obtenus avec le modèle shARN pour shRPL5 et shRPL11 : les transcrits de GATA-1, EIF2 α , CD71, ALAS2 et des globines sont peu exprimés par rapport aux contrôles. D'autre part, l'hémoglobinisation réduite chez les patients RPS19^{+/+} est confirmée par des dosages d'hème à J12 : l'hémisation des cellules au dernier jour de culture est légèrement diminuée chez le patient ABD591 RPS19^{mut/+} et diminuée de 40% chez le patient ABD631 RPS19^{+/+} (**Figure 51**).

B.3.4/ Dosages d'hème total

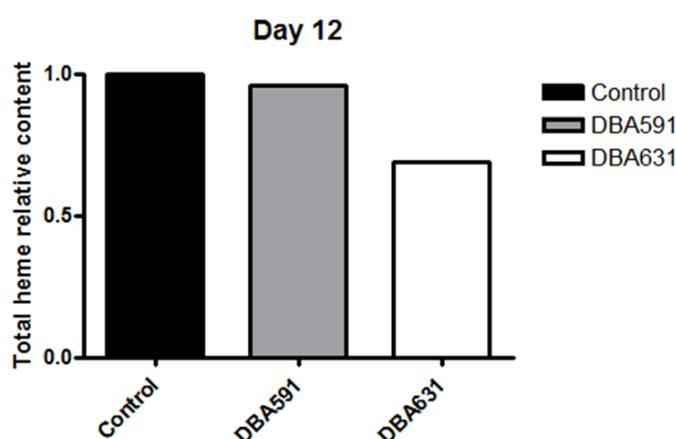


Figure 51. Dosage hème total chez deux patients atteints ABD à J12. DBA591 : patient RPS19^{mut/+} ; DBA631 : patient RPS19^{+/+}. Témoin contrôle fixé arbitrairement à 1.

Les cellules érythroïdes des patients porteurs de mutations sur d'autres gènes que RPS19 (RPS19^{+/+}) ont des phénotypes plus sévères *in vitro*. L'hémoglobinisation des cellules est réduite et retardée. L'expression de GATA-1 est très réduite en protéine et en ARNm. FLVCR1 est surexprimé pendant toute la cinétique (**Figures 46, 48 et 49**). Bach1 n'est pas exprimé (**Figures 48 et 49**) et il y a une production importante de FRO chez ces patients (**Figure 41**) suggérant une accumulation d'hème libre. Nous avons donc essayé de corriger le phénotype et le retard de différenciation de ces cellules *in vitro* en restaurant GATA-1.

III/ Expérience de sauvetage de GATA-1 via HSP70 et de réversion du phénotype des cellules "shRPL11" *in vitro*.

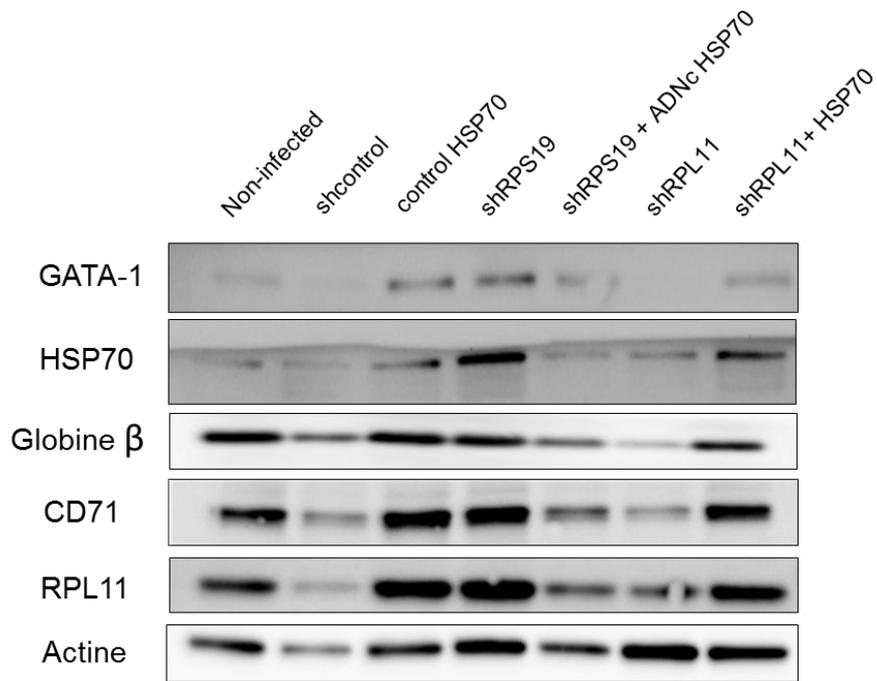
Nous avons précédemment décrit le rôle très important des protéines HSP90 et HSP70 au cours de l'érythropoïèse (voir Introduction). Mon collègue Marc Gastou, étudiant en thèse, a analysé le rôle de HSP70 au cours de l'ABD. Il a démontré *in vitro* que dans les conditions shRPL5 et shRPL11, l'expression protéique de HSP70 est diminuée du fait de sa dégradation par le protéasome (**Figures 1 et 4 Article 1 annexe 2**) mais pas pour la condition shRPS19. L'expression protéique de GATA-1 est diminuée pour toutes ces conditions comme nous

l'avons montré précédemment. Ces résultats ont été confirmés chez des patients mutés pour les gènes *RPS19*, *RPL11* et *RPL5* (**Figure 1 Article 1 annexe 2**). Aucune anomalie d'expression n'a été trouvée pour HSP90 (**Figure Supplemental 2 Article 1 annexe 2**). L'ensemble de ces travaux auxquels j'ai contribué est présenté dans l'annexe 2. Nous avons réalisé ensemble les expériences de synchronisation cellulaire (**Figures 1E et 2B de l'article 1, figure 36 de ma thèse**), de réversion du phénotype grâce à un ADNc codant pour HSP70 dans le modèle shARN (**figures 2A, 2C, 2D, 2E de l'article 1 et figure 52 à 55 de ma thèse**), et chez quelques patients (**figures 3F et 3B**). D'autre part, j'ai étudié l'expression de HSP70 et de GATA-1 au cours de la différenciation érythroïde chez d'autres patients et dans des expériences shARN (non-montrées). Enfin, mes résultats montrant un défaut d'hémoglobinisat ion au cours de l'ABD ont été utilisés dans le projet de Marc pour valider le sauvetage du phénotype ABD par HSP70 par augmentation de l'expression des globines.

De façon très intéressante et non prévue initialement, les deux projets de recherche se sont rejoints avec comme éléments communs GATA-1 et HSP70. Les deux projets de thèse sont en continuité : la thèse de Marc Gastou porte sur le rôle d'HSP70 sur GATA-1 au cours de l'ABD, et ma thèse porte sur le métabolisme de l'hème, du fer et l'implication d'une surcharge en hème comme élément aggravant du défaut de l'érythropoïèse au cours de cette maladie. Nous avons postulé que la dégradation de HSP70 chez les malades *RPS19*^{+/+} atteints d'ABD et dans les conditions shRPL5 et shRPL11 du modèle shARN mise en évidence par Marc Gastou était directement corrélée au défaut d'hémoglobinisat ion et au retard de différenciation que j'avais mis en évidence pour ces phénotypes à cause du rôle HSP70 sur GATA-1. Pour valider toutes nos hypothèses, nous avons réalisé une expérience de sauvetage indirect de GATA-1 *via* HSP70 sur un phénotype cellulaire sévère (inhibition de RPL11) et un phénotype cellulaire moins sévère (inhibition de RPS19).

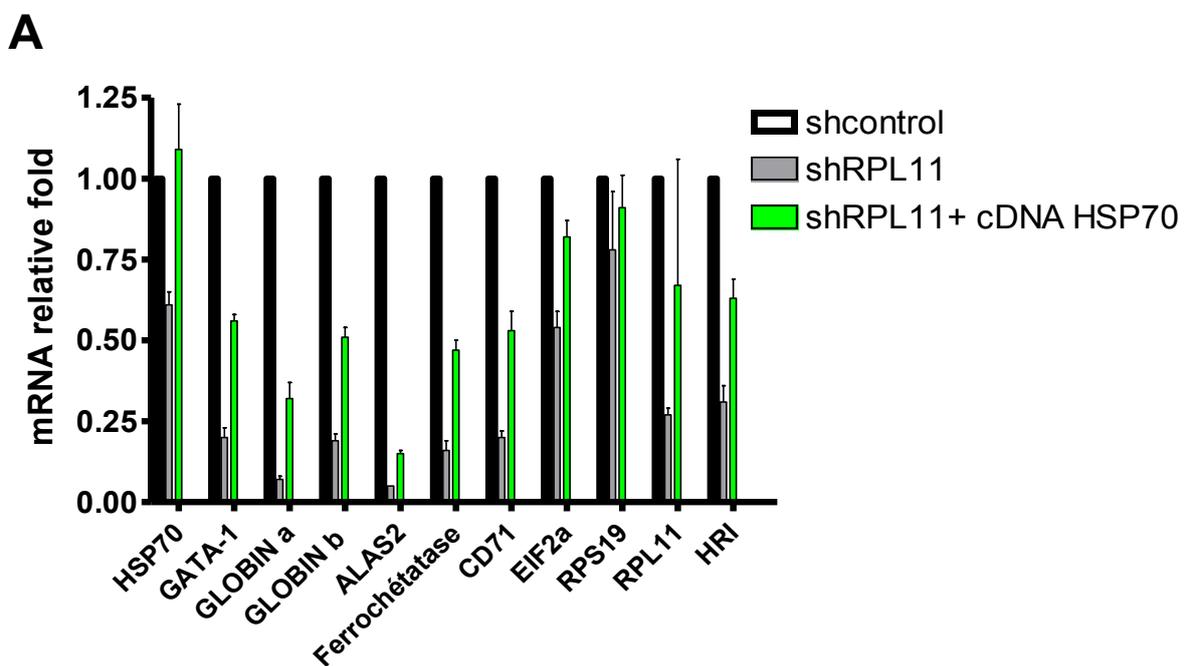
Les expériences de sauvetage ont été réalisées plusieurs fois chez des patients mutés pour les gènes *RPL11* ou *RPS19* (voir **Article 1**) ou dans le modèle shARN (**Figure 52**). Le sauvetage est réalisé grâce à un plasmide qui code pour un ADNc de HSP70 sauvage couplée à un tag mcherry. Quand HSP70-mcherry est surexprimée, elle est distribuée entre le cytoplasme et le noyau, augmentant ainsi la quantité totale de HSP70 dans la cellule. La transduction de HSP70 dans des CD34⁺ shRPS19 ou shRPL11 entraîne comme attendu une augmentation transcriptionnelle et protéique de HSP70 mais aussi une augmentation de l'expression transcriptionnelle et protéique de GATA-1 (+40% pour shRPS19 et +70% pour shRPL11) (**Figures 52 et 53**). GATA-1 activant sa propre transcription, il s'agit probablement d'une boucle de régulation positive de GATA-1 sur lui-même, bien qu'on ne puisse exclure qu'il s'agisse aussi de l'effet d'autres mécanismes (stabilisation de l'ARNm de

GATA-1 par HSP70 directement ou par une de ces cibles). L'augmentation de l'expression de GATA-1 conduit comme attendu à l'augmentation du nombre de transcrits d'ALAS2 et des globines α et β qui sont régulées par lui (**Figure 53**). L'expression transcriptionnelle et protéique de la globine β (+20% pour shRPS19 et +35% pour shRPL11) est augmentée. La quantité de globine β est multipliée par 3 pour la condition shRPL11 après transduction de HSP70 (**Figure 52**). Dans la condition shRPL11, l'expression transcriptionnelle de EIF2 α , RPS19, RPL11 et HRI est augmentée, signe que la traduction reprend (**Figure 53**). La prolifération cellulaire très réduite des cellules inhibées pour RPL11 (**Figure supplémentaire 2 Annexe 1**), augmente grâce à la transduction de HSP70 (**Figure 2A Article I Annexe 2**). D'autre part, la mortalité des cellules shRPL11 transduites avec HSP70 est diminuée d'un facteur 3 (**Figure 55**). L'augmentation de RPL11, n'est pas due à une inefficacité d'extinction du shARN, les cellules shRPL11 et shRPL11+ADNc HSP70 sont infectées par la même quantité du même virus et triées le même jour. D'autre part, on observe aussi une augmentation de l'expression protéique de RPL11 chez des patients mutés pour le gène *RPL11* après transduction de l'ADNc HSP70 sauvage. L'augmentation de l'expression de RPL11 pourrait indiquer une reprise de la traduction mais d'autres hypothèses peuvent être envisagées comme par exemple une interaction directe entre HSP70 et RPL11 et un rôle protecteur de HSP70 sur RPL11. Ceci reste à explorer et à valider.



Condition	Normalisation du signal par rapport aux protéines de ménage				
	GATA-1	HSP70	Globine β	CD71	RPL11
contrôle	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
shcontrôle HSP70	1,07	1,20	1,00	1,19	1,22
shRPS19	0,82	1,00	0,64	0,87	0,97
shRPS19 +ADNc HSP70	1,20	1,23	0,85	0,95	0,95
shRPL11	0,00	0,69	0,15	0,46	0,49
shRPL11 + ADNc HSP70	0,71	0,97	0,50	0,81	0,87

Figure 52. HSP70 permet de restaurer l'expression de GATA-1, l'hémoglobinisation et la différenciation des cellules CD34⁺ transduites avec un shRPL11 ou un shRPS19 à J9. Immuno-buvardages de GATA-1, CD71, de la globine β, HSP70 dans des CD34⁺ non-infectées, shcontrôle, shcontrôle ADNc HSP70, shRPS19, shRPS19 + ADNc HSP70, shRPL11 et shRPL11 + ADNc HSP70. Normalisation par rapport à la protéine de ménage.



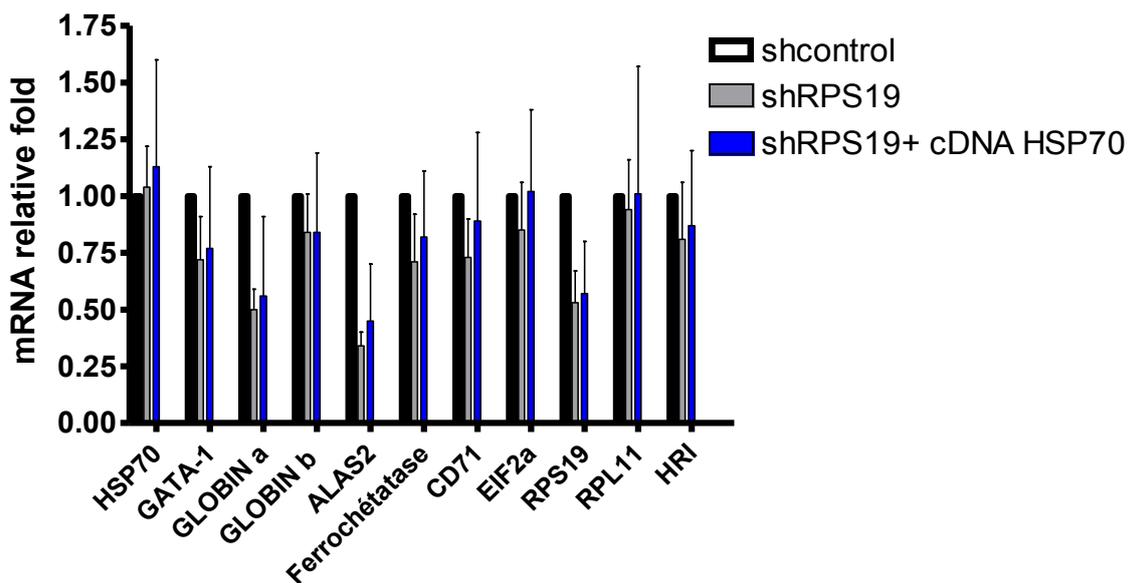
B

Figure 53. HSP70 permet de restaurer l'expression transcriptionnelle de GATA-1 et des globines dans les cellules shRPS19 et shRPL11 à J9. A/ RT-PCRq des gènes HSP70, GATA-1, des globines α et β (HBA et HBB), de ALAS2, de la ferrochélatase, EIF2 α , RPS19, RPL11, HRI et CD71 dans la condition shRPL11. A/ RT-PCRq des gènes HSP70, GATA-1, des globines α et β (HBA et HBB), de ALAS2, de la ferrochélatase, EIF2 α , RPS19, RPL11, HRI et CD71 dans la condition shRPS19. Pour chaque gène, le contrôle (shcontrol) est fixé arbitrairement à 1. Gène rapporteur : actine β

L'augmentation d'expression protéique de CD71 et de la globine β permet de dire que le retard de différenciation est sensiblement corrigé pour la condition shRPS19 (**Figure 52**). Le retard de différenciation très important de la condition shRPL11 semble amélioré (CD71 et globine β plus exprimées) mais pas entièrement corrigé. En effet, les expressions de CD71 (réduite de 20%) et de la globine β (réduite de 50%) sont encore inférieures au contrôle pour cette condition (**Figure 52**).

L'expression de FLVCR1 mesurée par cytométrie diminue de 4% dans la condition shRPL11 + ADNc HSP70 par rapport à la condition shRPL11 (**Figure 54C**). Cet effet est visible aussi pour la condition shRPS19, FLVCR1 est diminuée de 2,6% quand HSP70 est transduite. Cette diminution de l'expression de FLVCR1 dans la condition shRPL11 s'accompagne d'une diminution de production de FRO (**Figure 54B**), signe que la quantité d'hème libre diminue suite à la transduction de HSP70. Enfin, la quantité totale d'hème augmente dans la condition shRPL11+ ADNc HSP70 à un niveau comparable à la condition shRPS19 (**Figure 54A**). Ces données indiquent que la reprise de la traduction s'accompagne d'une augmentation de l'héminisation (confirmé par l'augmentation transcriptionnelle d'ALAS2, de la ferrochélatase et de CD71) et de l'hémoglobinsation cellulaire.

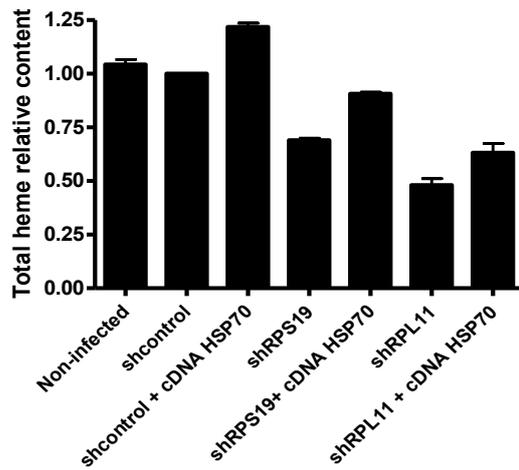
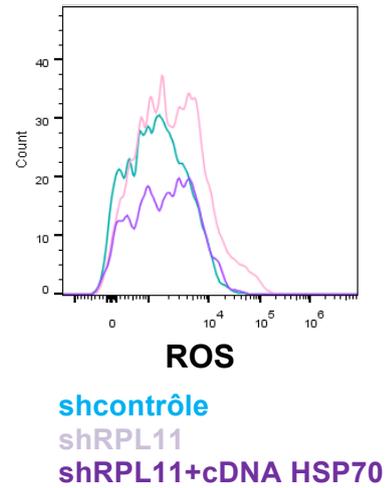
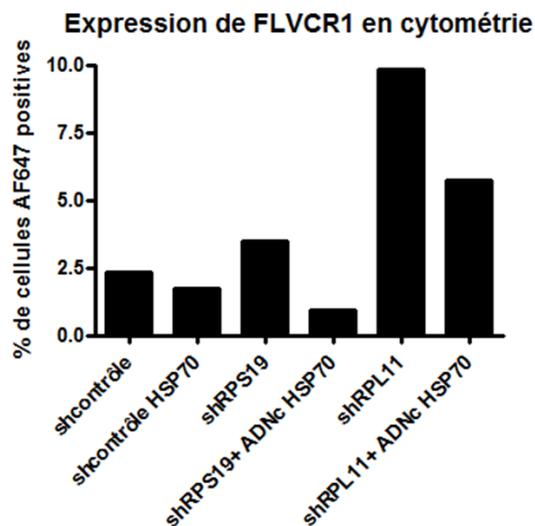
A**B****C**

Figure 54. Dosage d'hème total, production de FRO, et expression de FLVCR1 dans les conditions shRPS19, shRPS19 + ADNc HSP70, shRPL11 et shRPL11+ ADNc HSP70 par rapport au shcontrôle. A/ Dosage d'hème total pour les conditions non-infectée, shcontrôle, shcontrôle + ADNc HSP70, shRPS19, shRPS19 + ADNc HSP70, shRPL11 et shRPL11 + ADNc HSP70. B/ Mesure de la production de FRO par cytométrie en flux dans les conditions shcontrôle, shRPL11 et shRPL11 + ADNc HSP70. C/ Mesure de l'expression de FLVCR1 par cytométrie en flux dans les conditions shcontrôle, shcontrôle + ADNc HSP70, shRPS19, shRPS19 + ADNc HSP70, shRPL11 et shRPL11 + ADNc HSP70.

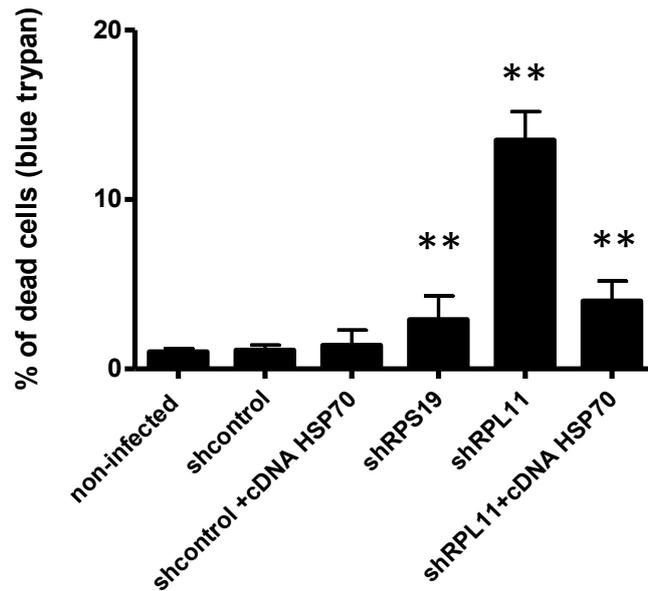


Figure 55. Pourcentage de mortalité cellulaire dans les conditions shRPs et contrôles avec ou sans HSP70. Mortalité mesurée par coloration au bleu trypan 0,2% dans les conditions non-infectée, shcontrôle, shcontrôle + ADNc HSP70, shRPS19, shRPS19 + ADNc HSP70, shRPL11 et shRPL11 + ADNc HSP70.

Conclusion

Nous avons étudié certaines protéines du métabolisme de l'hème, du fer et de l'érythropoïèse au cours de l'ABD. Nous avons écarté l'hypothèse d'une altération du métabolisme du fer au cours de l'ABD. Nous avons mis en évidence un défaut de synthèse des globines α et β pour toutes les mutations étudiées dû à un déficit de GATA-1. Le déficit de GATA-1 s'accompagne d'un retard de différenciation érythroïde visible par une expression des protéines impliquées dans la traduction protéique réduite (EIF2 α , RPs, HRI), une synthèse d'hème ralentie (diminution de l'expression d'ALAS2, de la ferrochelatase et de CD71). Le retard de différenciation des cellules érythroïdes s'accompagne d'une prolifération cellulaire réduite due à l'augmentation de la mortalité cellulaire. Enfin l'hème produit en début de différenciation favorise la transcription et la traduction des globines (Bach1 dégradé, HRI hypophosphorylée) qui est bloquée en raison du déficit en GATA-1. Ceci aboutit à une accumulation d'hème libre induisant une production de FRO nocive pour les cellules de façon plus ou moins transitoire. Les cellules essaient d'exporter cet excès d'hème libre en surexprimant FLVCR1.

Nous avons confirmé l'existence de deux phénotypes distincts *in vitro*. Le phénotype des cellules shRPS19 ou de cellules de patients mutés pour le gène *RPS19* est discret. Le retard de différenciation est très modéré, la prolifération cellulaire est peu réduite,

l'accumulation d'hème libre est faible et transitoire, comme l'expression de FLVCR1 et la production de FRO. L'expression de GATA-1 est faiblement réduite et ce mécanisme n'est pas HSP70-dépendant car HSP70 est exprimée normalement pour ce phénotype.

Au contraire, les phénotypes cellulaires shRPL5 et shRPL11 ou de patients mutés pour le gène *RPL5* ou *RPL11* sont sévères. La prolifération cellulaire est très réduite, la mortalité est élevée. L'accumulation d'hème libre est plus importante, FLVCR1 est surexprimé tout au long de la différenciation érythroïde et la production de FRO est plus élevée. Le retard de différenciation érythroïde est très important avec une diminution drastique de l'expression des globines et de GATA-1. L'expression réduite de GATA-1 est liée à la dégradation de sa protéine chaperonne HSP70, qui est dégradée dans ces phénotypes sévères.

Enfin, nous avons montré qu'une restauration de l'expression de GATA-1 grâce à HSP70 était possible. La restauration de GATA-1 induit une activation de sa propre transcription, une reprise de la différenciation érythroïde (synthèse des globines, de CD71), une baisse de l'accumulation d'hème libre (FLVCR1 moins exprimée, baisse de production des FRO), une reprise de la prolifération cellulaire et une baisse de la mortalité cellulaire. Les résultats présentés dans cette thèse feront l'objet d'un deuxième article qui est en cours d'écriture.

DISCUSSION
ET
PERSPECTIVES

Notre étude de l'érythropoïèse dans l'ABD nous a permis de découvrir que la synthèse des globines α et β est diminuée au cours de cette maladie. Cela n'avait jamais été montré auparavant dans des cellules humaines. Nous avons montré que les conséquences de ce défaut d'hémoglobination cellulaire entraînent une accumulation d'hème libre dans les cellules. L'accumulation d'hème libre constitue probablement un facteur aggravant de la maladie qui participe à l'apoptose observée. L'augmentation d'expression de FLVCR1 résulte d'un processus cellulaire adaptatif qui favorise l'export d'hème en excès favorisant ainsi la survie. D'autre part, nous avons cherché à comprendre les causes de ce défaut d'hémoglobination et nous avons mis en évidence un déficit d'expression de GATA-1. La cause du déficit en GATA-1 (rôle de HSP70) en cas d'haplo-insuffisance en RPL11 a été trouvée par Marc Gastou, ce qui nous a permis de réaliser des expériences de restauration de GATA-1 par HSP70 et de corriger significativement l'érythropoïèse dans cette maladie pour les phénotypes étudiés. L'ensemble de nos résultats permet de mieux comprendre les processus physiopathologiques impliqués dans l'ABD chez l'Homme. De plus, nous répondons à la question initiale de la thèse sur le tropisme érythroïde de la maladie dans lequel GATA-1 joue un rôle majeur. Enfin, nous avons été plus loin car nous avons réussi à corriger en partie le défaut d'hémoglobination que nous avons mis en évidence.

Confirmation de deux phénotypes cellulaires différents *in vitro* RPS19^{+Mut} et RPS19^{+/+}

Notre équipe a précédemment décrit l'existence d'un phénotype cellulaire sévère lié à une haplo-insuffisance en RPL11 avec un retard de différenciation érythroïde important, une prolifération cellulaire très diminuée, une apoptose accrue et un phénotype cellulaire moins sévère lié à une haplo-insuffisance en RPS19 avec un léger retard de différenciation, une prolifération cellulaire diminuée et une apoptose faible [213]. Notre étude confirme nos précédents résultats et l'existence de ces deux phénotypes cellulaires distincts *in vitro* RPS19^{+Mut} ou shRPS19 et RPS19^{+/+} ou shRPL5 et shRPL11. Le retard de différenciation érythroïde visible par l'expression diminuée des globines a été caractérisé pour chaque phénotype dans notre étude. Nous avons montré que le phénotype le plus sévère associé à une apoptose accrue était celui dans lequel la surcharge en hème libre et la production de FRO intracellulaire était la plus importante. Dans ce phénotype, la synthèse des globines et l'expression de GATA-1 sont très diminuées. Au contraire, dans le phénotype lié à une haplo-insuffisance en RPS19, l'apoptose est plus faible et la prolifération cellulaire est donc aussi moins diminuée, l'excès d'hème libre est faible et transitoire comme la production de FRO.

Enfin les globines et GATA-1 sont peu sous-exprimées et la différenciation érythroïde n'est que légèrement retardée. Le lien entre l'accumulation d'hème libre, la production de FRO et l'apoptose n'a pas été établi de manière directe mais nous avons montré que la restauration de l'expression de GATA-1 *via* HSP70 induisait une diminution d'expression de FLVCR1a, une diminution de production de FRO et une diminution de la mortalité cellulaire dans la condition shRPL11. Toutes ces convergences avec nos précédents résultats montrent que l'excès d'hème libre dans les cellules doit participer au moins pour partie à l'apoptose des cellules shRPL11.

Défaut d'hémoglobinisation et surcharge en hème libre au cours de l'ABD

Nous avons mis en évidence un défaut de synthèse des globines α et β au cours de l'ABD aux niveaux transcriptionnel et protéique dans des cellules humaines. Le déficit de production des chaînes de globines dans les cellules érythroïdes induit une accumulation d'hème libre chez les patients haplo-insuffisants en RPL5, RPL11 et RPS19 ou pour des mutations encore inconnues (patients RPS19^{+/+}) et dans le modèle *in vitro* reproduisant l'ABD après infection de cellules CD34⁺ par différents ARN interférants dirigés contre RPS19, RPL11 et RPL5. L'accumulation d'hème libre chez les patients n'a pas été quantifiée directement car le dosage spectrophotométrique d'hème libre requiert au minimum cent mille cellules, ce qui est difficile à obtenir pour les patients atteints d'ABD. Cependant, l'augmentation d'expression de FLVCR1, l'expression réduite du facteur de transcription Bach1 (chez les patients RPS19^{+/+}) et la production accrue de FRO mises en évidence chez les patients suggèrent une concentration d'hème libre augmentée.

L'excès d'hème libre que nous avons mis en évidence n'est pas dû à une synthèse d'hème augmentée puisque dans les conditions où l'excès d'hème libre est le plus important (conditions shRPL5 et shRPL11), les enzymes ALAS2 et ferrochélatase ainsi que l'importeur de fer CD71 sont peu exprimés. Un article récent confirme nos résultats dans un modèle poisson zèbre invalidé pour le gène *rpl11* qui présente une altération de production de cellules de la lignée érythroïde sans altération des lignées myéloïde et granulocytaire : les ARNm d'ALAS2 et de CD71 sont sous-exprimés [333]. De plus, même si la quantité d'hème totale n'est pas augmentée, le dosage d'hème total à J9 montre que la quantité d'hème totale n'est pas nulle dans les conditions shRPs (**Figure 30**). La quantité d'hème totale est réduite en moyenne de 40% dans les conditions shRPL5 et shRPL11 par rapport au contrôle et 25% en moyenne dans la condition shRPS19 alors que l'expression protéique des globines est réduite de 50% dans la condition shRPS19 et est encore plus drastiquement diminuée dans les

condition shRPL5 et shRPL11 par rapport au contrôle. L'hème active la transcription des globines *via* Bach1 et leur traduction *via* HRI. Il est donc synthétisé avant les globines durant la phase précoce de l'érythropoïèse. Nous avons démontré que la ferrochélatase est exprimée durant cette phase comme l'ALAS2 mais dans une moindre proportion, ce qui montre que la synthèse d'hème débute avant la synthèse des globines (**Figure 37**). D'autre part, on ne peut pas exclure une participation d'ALAS1 à la synthèse d'hème durant la phase précoce de la différenciation érythroïde. Une étude sur des érythroblastes de souris invalidée pour le gène *alas2* a montré que l'ARNm d'ALAS1 est augmenté quand ALAS2 est réprimée [349]. Une autre étude récente dans des K562 a montré qu'ALAS1 est exprimé jusqu'au stade proérythroblaste à partir duquel l'ALAS2 devient plus exprimée [350]. Cet hème accumulé durant l'érythropoïèse précoce active aussi la transcription et la traduction des globines dans l'ABD (Bach1 est dégradé et HRI hypophosphorylé) mais le déficit en ARNm des globines régulé par GATA-1 ne permet pas une synthèse adéquate des globines et l'hème synthétisé est libre dans la cellule. L'hème libre induit une production de FRO. La cellule active un mécanisme adaptatif qu'elle utilise normalement en début et en fin de différenciation érythroïde (**Figure 37**) : elle surexprime FLVCR1a et exporte l'hème en excès (voir schéma final **Figure 56**). On peut noter que si l'excès d'hème libre est très visible du point de vue protéique (sur l'expression de Bach1, la phosphorylation de HRI et FLVCR1), les valeurs relatives d'hème libre obtenues par dosage spectrophotométrique (5 à 7% dans les conditions shRPL5 et shRPL11 et 1 à 2% pour la condition RPS19) sont faibles ce qui peut suggérer que les mécanismes cellulaires permettant de limiter l'excès d'hème libre dans la cellule sont efficaces. Il aurait été intéressant de doser l'hème libre par spectrométrie de masse, mais cette technique nécessite des culots cellulaires d'au moins un million de cellules, ce qui est impossible à obtenir dans cette maladie hypoproliférative.

Le lien entre l'ABD et l'hème a été fait grâce aux modèles animaux invalidés pour FLVCR1 par les équipes du Dr Janis Akkowitz et du Dr Emmanuela Tolosano. Ces études ont montré que l'invalidation de FLVCR1 (forme a pour l'équipe Akkowitz et forme b pour l'équipe Tolosano) ou son blocage grâce au virus FLVc induisait une anémie chez les animaux qui présentaient des symptômes qui ressemblaient à ceux des patients atteints d'ABD : hypertélorisme, retard de croissance, malformations des extrémités, faces aplaties [170][173][334]. Plusieurs variations d'épissage de FLVCR1 ont été décrites dans la littérature chez les patients atteints d'ABD [178]. L'expression de ces protéines FLVCR1 tronquées dans des cellules K562 induit une sous-expression de FLVCR1 et/ou une protéine non-fonctionnelle [178]. Cependant, aucune mutation de FLVCR1 n'a été trouvée chez les patients [334]. Depuis le début de ma thèse, plusieurs articles ont suggéré un excès d'hème au

cours de l'ABD [335-337]. Un article de Mercurio et al. [336] montre que dans des cellules TF-1 et K562 invalidées pour RPS19, les expressions transcriptionnelles de FLVCR1 a et b sont diminuées par rapport aux contrôles (l'expression protéique de FLVCR1 n'est pas étudiée). L'expression réduite de FLVCR1 induit une surcharge d'hème total dans ces cellules, une production de FRO et une apoptose. Une étude récente de l'équipe du Dr Abkowitz montre au contraire une augmentation transcriptionnelle de FLVCR1 chez trois patients atteints d'ABD mutés pour le gène *RPS19* en fin de différenciation érythroïde [337]. Cette étude montre que l'érythropoïèse est bloquée dans l'ABD au stade proérythroblaste ou juste avant et qu'il existe un retard de maturation des cellules de patients qui sont synchronisées à quatre stades différents de différenciation érythroïde. L'hypothèse montrant un excès d'hème dans l'ABD est développée dans cet article. L'expression protéique d'ALAS2 est plus importante chez le patient que chez le contrôle à J7 alors que l'expression protéique et transcriptionnelle des globines α et β sont réduites : ceci s'accompagne d'une production de FRO et d'une apoptose à J7. Le traitement des cellules érythroïdes avec de la succinylacétone, un inhibiteur de la synthèse d'hème ou par de l'hémopexine dans le milieu améliore la différenciation des cellules des patients atteints d'ABD. Notre étude confirme le retard de différenciation et la décorrélation entre la synthèse d'hème et la synthèse des globines au cours de l'ABD. Notons que pour les patients mutés pour le gène *RPS19*, le phénotype cellulaire *in vitro* est très discret dans notre étude et que le retard de différenciation est peu marqué. Nous trouvons aussi une expression de FLVCR1 augmentée chez les patients mais au niveau protéique sans savoir s'il s'agit de la forme a ou b car les anticorps commerciaux ne permettent pas de différencier les deux formes. Dans la condition shRPS19 du modèle shARN et chez les patients mutés pour le gène *RPS19*, nous avons aussi mis en évidence une production de FRO. L'expression de l'ALAS2 est normale à légèrement diminuée dans notre étude mais elle n'est pas augmentée à J7. Toutefois les deux études ne sont pas directement superposables car nous n'avons pas synchronisé les cellules des patients au cours de la différenciation érythroïde. Nous avons nous-mêmes réalisés des expériences d'inhibition de la synthèse d'hème grâce à la succinylacétone (SA) en utilisant la même concentration que celle utilisée dans cet article mais contrairement à leur résultat le traitement à la SA augmentait les FRO par accumulation d'ALA, un intermédiaire toxique de la voie de biosynthèse de l'hème, ce qui augmentait le taux de mortalité des cellules. Nous n'avons pas trouvé d'effet bénéfique de ce traitement sur deux expériences indépendantes sur des CD34⁺ infectées par nos shARN. Enfin, les auteurs font l'hypothèse que l'excès d'hème mis en évidence est dû à une synthèse d'hème augmentée (augmentation de l'expression d'ALAS2) alors que nous postulons qu'il est en fait dû à une synthèse des globines diminuée à cause du déficit en GATA-1.

D'autre part, le défaut d'hémoglobinisatation au cours de l'ABD a été mis en évidence chez le poisson zèbre depuis 2012, dans un modèle déficient pour RPL5 [338] et dans des modèles déficients pour RPS19 et RPL11 [333]. Dans cette dernière étude, les auteurs montrent que l'expression protéique des globines est diminuée chez les poissons invalidés pour RPS19 et RPL11 mais pas au niveau transcriptionnel. Notre étude confirme l'expression protéique réduite des globines pour ces deux conditions, cependant nous trouvons également une expression transcriptionnelle significativement réduite.

Déficit en GATA-1 dans l'ABD

Concernant le déficit en GATA-1, plusieurs publications également ont été publiées depuis 2012. Deux publications de l'équipe d'H.Gazda/ V. Sankaran ont décrit des mutations récurrentes du site donneur d'épissage de l'exon 2 de GATA-1 chez les patients atteints d'ABD [251] [248]. Une mutation de l'ATG du gène *GATA-1* a été décrite en 2014 [249]. Au total, 5 patients atteints d'ABD ont été décrits comme porteurs de mutations dans le gène *GATA-1*. Ces mutations induisent un saut de l'exon 2 et aboutissent à la disparition du domaine de transactivation (TD) de GATA-1 et à l'expression d'une forme courte de GATA-1 non-fonctionnelle au lieu de la forme longue. Les cinq patients porteurs de mutations pour *GATA-1* ne permettent pas de rendre compte de l'ensemble des patients atteints d'ABD. Cependant, l'équipe d'H. Gazda/V. Sankaran a montré un lien entre un déficit d'expression de RPS19, RPL11, RPL5 et RPS24 et un défaut de traduction de GATA-1 [250]. Il existerait un défaut spécifique de traduction de GATA-1 du fait de la complexité structurale particulière de l'extrémité 5'UTR de l'ARNm de cette protéine. Ces résultats permettent de rattacher la physiopathologie d'un défaut de GATA-1 à l'ensemble des patients ABD porteurs de mutations dans les gènes de RPs qui représentent 70% des cas. Dans des modèles shARN sur des CD34⁺ issues de sang de cordon infectées par des shRPL5, shRPL11 et shRPS19, les auteurs ont montré une diminution protéique de GATA-1 (formes longue et courte) entre le sixième et de septième jour de culture pour les trois phénotypes. Comme décrit par les auteurs, plus l'extinction des RPs est importante plus l'expression protéique de GATA-1 est diminuée ce que nous observons également. L'expression transcriptionnelle de GATA-1 pour la condition shRPS19 et chez les patients mutés pour le gène *RPS19* est normale entre J5 et J7. Nous avons mis en évidence une expression transcriptionnelle et protéique diminuée de GATA-1 pour ce phénotype à J9. Entre J5 et J7, l'expression transcriptionnelle de GATA-1 est moins importante qu'à J9, et GATA-1 régule lui-même sa propre transcription. Ainsi, il est normal que le défaut de traduction de GATA-1 en début de différenciation érythroïde finisse par diminuer son expression transcriptionnelle vers J9. Enfin cette équipe a réalisé un sauvetage de GATA-1 dans des cellules de patients mutés pour le gène *RPS19* grâce à un

ADNc de GATA-1 avec une extrémité 5'UTR modifiée. Le sauvetage de GATA-1 *in vitro* dans ces cellules a augmenté la différenciation érythroïde ainsi que la transcription de l'ALAS2 et des globines qui sont des cibles transcriptionnelles de GATA-1. Des résultats similaires ont été obtenus pour notre sauvetage de GATA-1 grâce à un ADNc de HSP70 sauvage. Nous montrons en plus un effet positif du sauvetage de GATA-1 sur l'expression transcriptionnelle de protéines impliquées dans la traduction (EIF2 α , HRI, RPs) et une diminution de l'expression de FLVCR1 qui montre une diminution de la quantité d'hème libre dans ces cellules secondaire à la reprise de synthèse des globines.

La traduction au cours de l'ABD

Nous sommes la première équipe à avoir étudié l'expression des protéines EIF2 α (forme phosphorylée et non-phosphorylée) et HRI dans l'anémie de Blackfan-Diamond. Il n'existe pas à notre connaissance d'autre étude sur ce sujet. Ces protéines ont beaucoup été étudiées par l'équipe du Dr Jane Jane Chen dans des situations de déficit en hème [342-343] mais pas dans des situations d'excès d'hème libre comme c'est le cas dans l'ABD. Nous avons trouvé des expressions transcriptionnelles et protéiques de HRI et de EIF2 α très diminuées dans les cellules déficientes en RPL5 et en RPL11, et légèrement diminuées dans le cas d'un déficit en RPS19 par rapport au shcontrôle. L'expression de ces protéines augmente au cours de la différenciation érythroïde et il n'est pas surprenant que leur expression soit réduite dans l'ABD à J6 et J9 à cause du retard de différenciation des cellules dans cette maladie. D'autre part, la traduction n'est pas inhibée au cours de l'ABD car la forme phosphorylée de EIF2 α n'est pas plus exprimée que la forme non-phosphorylée. Enfin, HRI est sous forme hypophosphorylée dans les conditions shRPL5 et shRPL11 du modèle shARN qui sont les conditions dans lesquelles la quantité d'hème libre est la plus importante. Ce qui signifie que HRI n'est pas active dans ces conditions, ce qui favorise la traduction. Au vu de ces résultats on peut donc conclure qu'il ne semble pas y avoir d'inhibition de la synthèse protéique au cours de l'ABD dans les conditions shRPL5, shRPL11 et shRPS19 qui puisse rendre compte du déficit de globines observé. Toutefois, pour les conditions shRPL5 et shRPL11 surtout, la traduction est moindre que dans la condition shRPS19 et shcontrôle car HRI et EIF2 α sont peut exprimées.

Le métabolisme du fer au cours de l'ABD

Au début de ma thèse, il n'y avait qu'une seule étude sur le métabolisme du fer dans l'anémie de Blackfan-Diamond qui montrait une surcharge en fer chez trente et un patients transfusés d'une cohorte italienne [340]. Nous avons étudié le métabolisme du fer chez des patients non-transfusés dont quatre traités avec des corticostéroïdes et un en indépendance

thérapeutique. Nous avons montré qu'il n'y avait ni surcharge ni déficit en fer chez les patients non-transfusés. La dysérythropoïèse observée dans l'ABD semble donc exclure une anomalie du métabolisme du fer. Une autre étude a été publiée en 2013 [341]. Le métabolisme du fer a été étudié dans une cohorte de quatorze patients tchèques dont dix patients étaient régulièrement transfusés, deux patients étaient traités avec des stéroïdes et deux patients étaient en rémission. Des surcharges en fer ont été relevées chez les patients transfusés mais il n'y a pas de déficit ou de surcharge en fer chez les patients traités avec des stéroïdes ou en rémission en accord avec nos résultats. D'autre part, cette étude confirme la concentration sérique d'EPO élevée chez les patients transfusés ou non, ce que nos résultats confirment également. Une étude parue en 2014 [339] montre que chez les patients atteints d'ABD transfusés, les concentrations d'hepcidine et de fer sont importantes comme nous le décrivons dans notre étude conformément à ce qui était attendu. Ils montrent également que la transferrine disponible est saturée en fer et est sous-utilisée par la moelle osseuse. Le fer issu de la dégradation des globules rouges des transfusions d'accumule donc dans la circulation sous forme libre (No Transferrin Bound Iron NTBI) induisant une surcharge en fer et des effets secondaires liés aux transfusions.

Discussion sur le modèle shARN utilisé

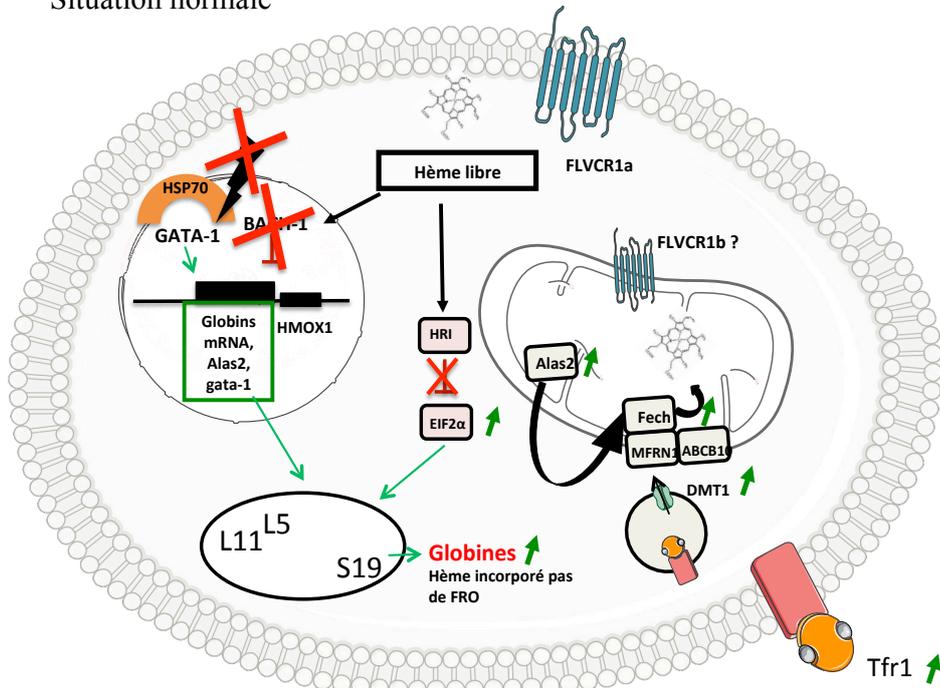
La sévérité des phénotypes observés *in vitro* pour les différentes conditions shARN étudiées dépend du pourcentage d'inhibition des RPs. Plus l'inhibition transcriptionnelle et protéique de la protéine ribosomique est importante plus le phénotype est sévère. Les mutations chez les patients sont hétérozygotes. L'équipe d'Hana Gazda a montré chez des patients mutés pour *RPS19* que seulement la moitié des protéines RPS19 chez ces patients sont fonctionnelles ce que nous atteignons en cas d'haploinsuffisance en RPS19 et chez les patients [255]. En revanche, le modèle shARN pour les conditions shRPL5 et shRPL11 avec 80% d'extinction transcriptionnelle et protéique est plus drastique que ce que l'on observe dans les conditions physiologiques. Cependant, nous avons pu montrer que les cellules issues de patients porteurs de mutations dans les gènes *RPL5*, *RPL11* ou des gènes encore non-identifiés (phénotype RPS19^{+/+}) se comportaient comme les CD34⁺ issues de sang de cordon invalidées pour RPL5 ou RPL11. L'intérêt du modèle shARN est surtout d'avoir un plus grand nombre de cellules pour les expériences par rapport aux cellules de patients qui prolifèrent très peu *in vitro* et qui sont difficiles à obtenir comme dans toutes les recherches sur des maladies rares. Nous réalisons donc nos expériences préliminaires grâce au modèle shARN et nous confirmons ensuite nos résultats dans les cellules de patients. Le modèle shARN malgré ses imperfections permet comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la maladie. Cependant, le pourcentage d'inhibition des RPs n'est pas

maîtrisable et les expériences sont longues à réaliser (production des virus, infections, tris cellulaires, culture cellulaire sur 12 jours,...). Notre technique est donc perfectible. La possibilité d'une utilisation de la technologie CRISPR/CAS9 sur des CD34⁺ a déjà été démontrée [331]. Cette technologie pourrait être utilisée pour inhiber les RPs de façon hétérozygote, ce qui permettrait peut être d'obtenir un plus grand nombre de cellules pour réaliser les expériences. D'autre part, l'utilisation de clones, permettrait de maîtriser l'inhibition transcriptionnelle des RPs, ce qui n'est pas le cas avec les infections virales. Le temps gagné sur les expériences serait très important, car cette technologie permettrait de s'affranchir de la production de virus et du temps d'infection. Toutefois, l'utilisation de la technologie CRISPR/CAS9 dans des CD34⁺ reste difficile et il existe une grande probabilité d'invalider par accident d'autres gènes ("off-targets"). L'établissement de lignées immortalisées HUDEP (cellules iPSC) à partir de CD34⁺ de patients pourrait aussi être une solution [332].

Pour conclure, nous pouvons dire au regard de tous nos résultats que le déficit en GATA-1 qu'il soit dû à la dégradation de HSP70 ou à un défaut de traduction semble expliquer le tropisme érythroïde de l'ABD. On commence à comprendre le lien entre le déficit de RPs et le défaut de traduction de GATA-1 mais il nous reste à expliquer le déficit de HSP70 pour certains phénotypes. Bien que HSP70 ne soit pas dégradée en cas d'haplo-insuffisance en RPS19, la transduction d'une HSP70 sauvage dans ces cellules permet quand même d'améliorer sensiblement la différenciation érythroïde, probablement dû à l'augmentation d'expression de GATA-1. Il serait donc très intéressant d'augmenter l'expression de HSP70 chez les patients atteints d'ABD, pour restaurer l'expression de GATA-1, des globines et de la différenciation érythroïde et ainsi prévenir la formation de FRO par accumulation d'hème libre et l'apoptose des cellules érythroïdes dans cette maladie (voir schéma final **Figure 56**). Cette protéine chaperonne constitue une cible thérapeutique très prometteuse pour guérir les patients atteints d'ABD. On peut penser que des approches thérapeutiques par thérapie génique ciblant HSP70 pourront être envisagées dans le futur.

A

Situation normale

**B**

ABD

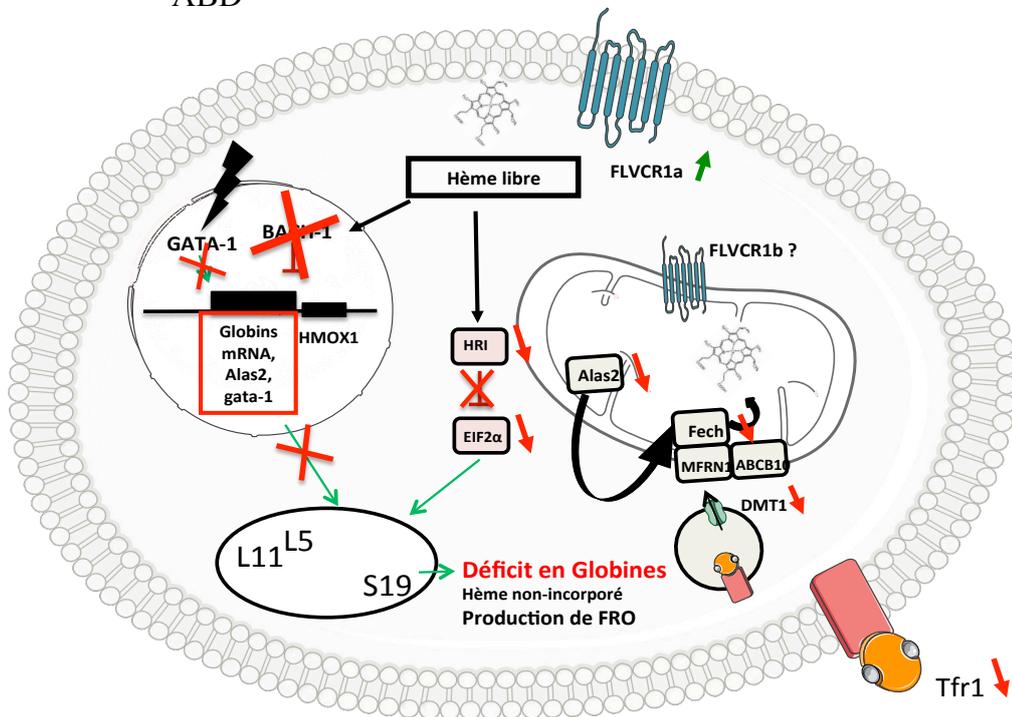


Figure 56. Schéma récapitulatif final. A/ Situation normale. En début de différenciation érythroïde, l'hème active la synthèse des globines en réprimant Bach1 et HRI. Parallèlement GATA-1 active la transcription des globines et de l'ALAS2. Les transcrits sont traduits et l'hème libre s'incorpore dans les globines naissantes. La traduction (EIF2 α , les RPs), la synthèse d'hème (ALAS2, Ferrochélatase) et l'import de fer (CD71 et DMT1) augmentent. **B/ Situation pathologique (ABD).** En début de différenciation érythroïde, l'hème active la synthèse des globines en réprimant Bach1 et HRI. L'expression de GATA-1 est réduite (dû à la dégradation de HSP70 ou pas en fonction de la RP mutée). La transcription des globines et de l'ALAS2 est réduite. Dans le cytosol l'hème est en excès car il ne peut pas s'incorporer aux globines. Cette situation induit une production de FRO. La cellule exporte l'hème en excès en surexprimant FLVCR1a.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Dzierzak E, Philipsen S. Erythropoiesis : Development and Differentiation. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2013 Apr 1; 3(4) : a011601–a011601
2. Wu AM, Till JE, Siminovitch L, McCulloch EA. Cytological evidence for a relationship between normal hematopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system. The Journal of experimental medicine. 1968; 127(3) : 455–64
3. Chasis JA, Mohandas N. Erythroblastic islands : niches for erythropoiesis. Blood. 2008 Aug 1; 112(3) : 470–8.
4. Woolthuis CM, Park CY. Hematopoietic stem/progenitor cell commitment to the megakaryocyte lineage. Blood. 2016; 127(10) : 1242–8
5. Hu M, Krause D, Greaves M, Sharkis S, Dexter M, Heyworth C, et al. Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. Genes & Development. 1997 Mar 15; 11(6) : 774–85
6. Müller AM1, Medvinsky A, Strouboulis J, Grosveld F, Dzierzak E. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. Immunity. 1994 Jul; 1(4) : 291-301
7. Gekas C, Dieterlen-Lièvre F, Orkin SH, Mikkola HK. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. Dev Cell. 2005 Mar; 8(3) : 365-75
8. Godin I, Cumano A. [Hematopoietic stem cells : where do they come from at last?]. Med Sci (Paris). 2007 Aug-Sep; 23(8-9) : 681-4
9. Gurevitch O, Slavin S, Feldman AG. Conversion of red bone marrow into yellow - Cause and mechanisms. Med Hypotheses. 2007; 69(3) : 531-6
10. Van Pel M, Fibbe WE, Schepers K. The human and murine hematopoietic stem cell niches : are they comparable? Ann N Y Acad Sci. 2016 Apr; 1370(1) : 55-64
11. Boulais PE, Frenette PS. Making sense of hematopoietic stem cell niches. Blood. 2015 Apr 23; 125(17) : 2621-9
12. Fernández KS, de Alarcón PA. Development of the hematopoietic system and disorders of hematopoiesis that present during infancy and early childhood. Pediatr Clin North Am. 2013 Dec; 60(6) : 1273-89
13. Iscove NN. The role of erythropoietin in regulation of population size and cell cycling of early and late erythroid precursors in mouse bone marrow. Cell Tissue Kinet. 1977 Jul; 10(4) : 323-34
14. Stem Cell Assays, Volume 407 Par Mohan C. Vemuri. 2007
15. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. Cell. 1995 Oct 6; 83(1) : 59-67
16. Hu J, Liu J, Xue F, Halverson G, Reid M, Guo A, Chen L, Raza A, Galili N, Jaffray J, Lane J, Chasis JA, Taylor N, Mohandas N, An X. Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages : implications for understanding of normal and

disordered erythropoiesis in vivo. *Blood*. 2013 Apr 18; 121(16) : 3246-53

17. mc.med.univ-tours.fr/Pages/Hemato/DES/A12-Erythropoiese.htm

18. Moore E, Bellomo R. Erythropoietin (EPO) in acute kidney injury. *Ann Intensive Care*. 2011 Mar 21; 1(1) : 3.

19. Fried W, Kilbridge T, Krantz S, McDonald TP, Lange RD. Studies on extrarenal erythropoietin. *J Lab Clin Med*. 1969 Feb; 73(2) : 244-8

20. Carnot P, Deflandre G. Sur l'activité hemopoietique du serum au cours de la régénération du sang. *Compte-rendu Académie Science Paris*. 1906; 143 : 384-386

21. Gassmann M, Muckenthaler MU. Adaptation of iron requirement to hypoxic conditions at high altitude. *J Appl Physiol* (1985). 2015 Dec 15; 119(12) : 1432-40

22. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia : O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J*. 2002 Aug; 16(10) : 1151-62

23. Taylor M, Qu A, Anderson ER, Matsubara T, Martin A, Gonzalez FJ, Shah YM. Hypoxia-inducible factor-2 α mediates the adaptive increase of intestinal ferroportin during iron deficiency in mice. *Gastroenterology*. 2011 Jun; 140(7) : 2044-55

24. Lok CN, Ponka P. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem*. 1999 Aug 20; 274(34) : 24147-52

25. Mukhopadhyay CK, Mazumder B, Fox PL. Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J Biol Chem*. 2000 Jul 14; 275(28) : 21048-54

26. Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, Choi AM. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem*. 1997 Feb 28; 272(9) : 5375-81

27. Linder MC. Mobilization of stored iron in mammals : a review. *Nutrients*. 2013 Oct 10; 5(10) : 4022-50

28. John P. Greer, Daniel A. Arber, Bertil Glader, Alan F. List, Robert T. Means, Frixos Paraskevas, George M. Rodgers, *Wintrobe's Clinical Hematology*. 2014

29. Beaumont C, Canonne-Hergaux F. [Erythrophagocytosis and recycling of heme iron in normal and pathological conditions; regulation by hepcidin]. *Transfus Clin Biol*. 2005 Jun; 12(2) : 123-30

30. Santambrogio P, Biasiotto G, Sanvito F, Olivieri S, Arosio P, Levi S. Mitochondrial ferritin expression in adult mouse tissues. *J Histochem Cytochem*. 2007 Nov; 55(11) : 1129-37

31. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, Vulpe CD, Simpson RJ, McKie AT. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*. 2005 Sep 9; 122(5) : 789-801

32. Le Blanc S, Garrick MD, Arredondo M. Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012 Jun 15; 302(12) : C17805

33. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci*. 2014 Feb; 19(2) : 164-74. Review.
34. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, Vaulont S. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 17; 98(15) : 8780-5
35. Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet*. 2014 Jul; 46(7) : 678-84
36. Semenza GL. Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis. *Blood*. 2009 Sep 3; 114(10) : 2015-9
37. Chow A, Huggins M, Ahmed J, Hashimoto D, Lucas D, Kunisaki Y, Pinho S, Leboeuf M, Noizat C, van Rooijen N, Tanaka M, Zhao ZJ, Bergman A, Merad M, Frenette PS. CD169⁺ macrophages provide a niche promoting erythropoiesis under homeostasis and stress. *Nat Med*. 2013 Apr; 19(4) : 429-36
38. Hanspal M, Smockova Y, Uong Q. Molecular identification and functional characterization of a novel protein that mediates the attachment of erythroblasts to macrophages. *Blood* 1998; 92 : 2940-2950
39. Soni S, Bala S, Gwynn B, Sahr KE, Peters LL, Hanspal M. Absence of erythroblast macrophage protein (Emp) leads to failure of erythroblast nuclear extrusion. *J Biol Chem* 2006; 281 : 20181-20189
40. Sadahira Y, Yoshino T, Monobe Y. Very late activation antigen 4-vascular cell adhesion molecule 1 interaction is involved in the formation of erythroblastic islands. *J Exp Med* 1995; 181 : 411-415
41. Lee G, Lo A, Short SA, et al. Targeted gene deletion demonstrates that the cell adhesion molecule ICAM-4 is critical for erythroblastic island formation. *Blood* 2006; 108 : 2064-2071
42. Anselmo A, Lauranzano E, Soldani C, Ploia C, Angioni R, D'amico G, Sarukhan A, Mazzon C, Viola A. Identification of a novel agrin-dependent pathway in cell signaling and adhesion within the erythroid niche. *Cell Death Differ*. 2016
43. Kawane K, Fukuyama H, Kondoh G, et al. Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science* 2001; 292 : 1546-1549
44. Yoshida H, Kawane K, Koike M, Mori Y, Uchiyama Y, Nagata S. Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature* 2005; 437 : 754-758
45. Leimberg MJ, Prus E, Konijn AM, Fibach E. Macrophages function as a ferritin iron source for cultured human erythroid precursors. *J Cell Biochem* 2008; 103 : 1211-1218
46. Testa U. Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia*. 2004 Jul; 18(7) : 1176-99
47. De Maria R, Zeuner A, Eramo A, et al. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 1999; 401 : 489-493

48. Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 25; 98(20) : 10983-5
49. Koury MJ, Bondurant MC. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science*. 1990 Apr 20; 248(4953) : 378-8
50. Richmond TD, Chohan M, Barber DL. Turning cells red : signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol*. 2005 Mar; 15(3) : 146-55
51. Zon LI, Youssoufian H, Mather C, Lodish HF, Orkin SH. Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Dec 1; 88(23) : 10638-41.
52. Neubauer H, Cumano A, Müller M, Wu H, Huffstadt U, Pfeffer K. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell*. 1998 May 1; 93(3) : 397-409
53. Huang LJ, Constantinescu SN, Lodish HF. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol Cell*. 2001; 8 : 1327-1338
54. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*. 1993; 74 : 227-236
55. Chin H, Arai A, Wakao H, Kamiyama R, Miyasaka N, Miura O. Lyn physically associates with the erythropoietin receptor and may play a role in activation of the Stat5 pathway. *Blood*. 1998; 91 : 3734-3745
56. Schmidt U, van den Akker E, Parren-van Amelsvoort M, et al. Btk is required for an efficient response to erythropoietin and for SCF-controlled protection against TRAIL in erythroid progenitors. *J Exp Med*. 2004; 199 : 785-795
57. Ingley E, McCarthy DJ, Pore JR, et al. Lyn deficiency reduces GATA-1, EKLF and STAT5, and induces extramedullary stress erythropoiesis. *Oncogene*. 2005; 24 : 336-343
58. Halupa A, Bailey ML, Huang K, Iscove NN, Levy DE, Barber DL. A novel role for STAT1 in regulating murine erythropoiesis : deletion of STAT1 results in overall reduction of erythroid progenitors and alters their distribution. *Blood*. 2005; 105 : 552-561
59. Quelle FW, Wang D, Nosaka T, et al. Erythropoietin induces activation of Stat5 through association with specific tyrosines on the receptor that are not required for a mitogenic response. *Mol Cell Biol*. 1996; 16 : 1622-1631
60. Fang J, Menon M, Kapelle W, et al. EPO modulation of cell-cycle regulatory genes, and cell division, in primary bone marrow erythroblasts. *Blood*. 2007; 110 : 2361-2370
61. Kerenyi MA, Grebien F, Gehart H, Schiffrer M, Artaker M, Kovacic B, Beug H, Moriggl R, Müllner EW. Stat5 regulates cellular iron uptake of erythroid cells via IRP-2 and TfR-1. *Blood*. 2008 Nov 1; 112(9) : 3878-88
62. Sathyanarayana P, Dev A, Fang J, et al. EPO receptor circuits for primary erythroblast survival. *Blood*. 2008; 111 : 5390-5399

63. Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, Brugnara C, Lodish HF. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice : a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell*. 1999; 98 : 181-191
64. Motoyama N, Kimura T, Takahashi T, Watanabe T, Nakano T. bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *J Exp Med*. 1999; 189 : 1691-1698
65. Grillot DA, Gonzalez-Garcia M, Ekhterae D, et al. Genomic organization, promoter region analysis, and chromosome localization of the mouse bcl-x gene. *J Immunol*. 1997; 158 : 4750-4757
66. Garcon L, Rivat C, James C, et al. Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. *Blood*. 2006; 108 : 1551-1554
67. Dolznig H, Habermann B, Stangl K, et al. Apoptosis protection by the Epo target Bcl-X(L) allows factor-independent differentiation of primary erythroblasts. *Curr Biol*. 2002; 12 : 1076-1085
68. Constantinescu SN, Ghaffari S, Lodish HF. The Erythropoietin Receptor : Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction. *Trends Endocrinol Metab*. 1999; 10 : 18-23
69. Klingmuller U. The role of tyrosine phosphorylation in proliferation and maturation of erythroid progenitor cells--signals emanating from the erythropoietin receptor. *Eur J Biochem*. 1997; 249 : 637-647
70. Lecoq-Lafon C, Verdier F, Fichelson S, et al. Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of GAB1 and its association with SHC, SHP2, SHIP, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Blood*. 1999; 93 : 2578-2585
71. Sivertsen EA, Hystad ME, Gutzkow KB, et al. PI3K/Akt-dependent Epo-induced signalling and target genes in human early erythroid progenitor cells. *Br J Haematol*. 2006; 135 : 117-128
72. Somervaille TC, Linch DC, Khwaja A. Growth factor withdrawal from primary human erythroid progenitors induces apoptosis through a pathway involving glycogen synthase kinase-3 and Bax. *Blood*. 2001; 98 : 1374-1381
73. Gilley J, Coffey PJ, Ham J. FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J Cell Biol*. 2003 Aug 18; 162(4) : 613-22
74. Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*. 1995 Jan 27; 80(2) : 285-91
75. Kadri Z, Maouche-Chretien L, Rooke HM, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt induced by erythropoietin renders the erythroid differentiation factor GATA-1 competent for TIMP-1 gene transactivation. *Mol Cell Biol*. 2005; 25 : 7412-7422
76. Leung CG, Xu Y, Mularski B, Liu H, Gurbuxani S, Crispino JD. Requirements for survivin in terminal differentiation of erythroid cells and maintenance of hematopoietic stem

and progenitor cells. *J Exp Med.* 2007; 204 : 1603-1611

77. Mastromarino V, Volpe M, Musumeci MB, Autore C, Conti E. Erythropoietin and the heart : facts and perspectives. *Clin Sci (Lond).* 2011 Jan; 120(2) : 51-63

78. Sui X, Krantz SB, You M, Zhao Z. Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis. *Blood.* 1998; 92 : 1142-1149

79. Mori M, Uchida M, Watanabe T, et al. Activation of extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 induces Bcl-xL up-regulation via inhibition of caspase activities in erythropoietin signaling. *J Cell Physiol.* 2003; 195 : 290-297

80. Jacobs-Helber SM, Sawyer ST. Jun N-terminal kinase promotes proliferation of immature erythroid cells and erythropoietin-dependent cell lines. *Blood.* 2004; 104 : 696-703

81. Shimizu R, Komatsu N, Nakamura Y, Nakauchi H, Nakabeppu Y, Miura Y. Role of c-jun in the inhibition of erythropoietin receptor-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 222 : 1-6

82. Tong W, Zhang J, Lodish HF. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood.* 2005; 105 : 4604-4612

83. Walrafen P, Verdier F, Kadri Z, Chretien S, Lacombe C, Mayeux P. Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood.* 2005; 105 : 600-608

84. Klingmuller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell.* 1995; 80 : 729-738

85. Sasaki A, Yasukawa H, Shouda T, Kitamura T, Dikic I, Yoshimura A. CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J Biol Chem.* 2000; 275 : 29338-29347

86. Tong W, Zhang J, Lodish HF. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood.* 2005; 105 : 4604-4612

87. Birkmann J, Oez S, Smetak M, Kaiser G, Kappauf H, Gallmeier WM. Effects of recombinant human thrombopoietin alone and in combination with erythropoietin and early-acting cytokines on human mobilized purified CD34+ progenitor cells cultured in serum-depleted medium. *Stem Cells.* 1997; 15(1) : 18-32.

88. von Lindern M, Schmidt U, Beug H. Control of erythropoiesis by erythropoietin and stem cell factor : a novel role for Bruton's tyrosine kinase. *Cell Cycle.* 2004 Jul; 3(7) : 876-9

89. Wang W, Horner DN, Chen WL, Zandstra PW, Audet J. Synergy between erythropoietin and stem cell factor during erythropoiesis can be quantitatively described without co-signaling effects. *Biotechnol Bioeng.* 2008 Apr 1; 99(5) : 1261-72

90. Kushner JP. Late-onset hereditary anemia : why the delay? *J Clin Invest.* 1995 Oct; 96(4) : 1695

91. Koury MJ, Ponka P. New insights into erythropoiesis : the roles of folate, vitamin B12,

and iron. *Annu Rev Nutr.* 2004; 24 : 105-31.

92. Muta K, Krantz SB, Bondurant MC, Wickrema A. Distinct roles of erythropoietin, insulin-like growth factor I, and stem cell factor in the development of erythroid progenitor cells. *J Clin Invest.* 1994 Jul; 94(1) : 34-43

93. Bauer A, Tronche F, Wessely O, Kellendonk C, Reichardt HM, Steinlein P, Schütz G, Beug H. The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis. *Genes Dev.* 1999 Nov 15; 13(22) : 2996-3002

94. Kato H, Ishida J, Imagawa S, Saito T, Suzuki N, Matsuoka T, Sugaya T, Tanimoto K, Yokoo T, Ohneda O, Sugiyama F, Yagami K, Fujita T, Yamamoto M, Nangaku M, Fukamizu A. Enhanced erythropoiesis mediated by activation of the renin-angiotensin system via angiotensin II type 1a receptor. *FASEB J.* 2005 Dec; 19(14) : 2023-5

95. Roy CN, Andrews NC. Anemia of inflammation : the hepcidin link. *Curr Opin Hematol.* 2005 Mar; 12(2) : 107-11

96. Dallaglio G, Law E, Means RT Jr. Hepcidin inhibits in vitro erythroid colony formation at reduced erythropoietin concentrations. *Blood.* 2006 Apr 1; 107(7) : 2702-4

97. Xiao W, Koizumi K, Nishio M, Endo T, Osawa M, Fujimoto K, Sato I, Sakai T, Koike T, Sawada Ki. Tumor necrosis factor-alpha inhibits generation of glycophorin A+ cells by CD34+ cells. *Exp Hematol.* 2002 Nov; 30(11) : 1238-47

98. Felli N, Pedini F, Zeuner A, Petrucci E, Testa U, Conticello C, Biffoni M, Di Cataldo A, Winkles JA, Peschle C, De Maria R. Multiple members of the TNF superfamily contribute to IFN-gamma-mediated inhibition of erythropoiesis. *J Immunol.* 2005 Aug 1; 175(3) : 1464-72

99. Zermati Y, Fichelson S, Valensi F, Freyssinier JM, Rouyer-Fessard P, Cramer E, Guichard J, Varet B, Hermine O. Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors. *Exp Hematol.* 2000 Aug; 28(8) : 885-94

100. Weiss MJ, dos Santos CO. Chaperoning erythropoiesis. *Blood.* 2009 Mar 5; 113(10) : 2136-44

101. Kirschke E, Goswami D, Southworth D, Griffin PR, Agard DA. Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles. *Cell.* 2014 Jun 19; 157(7) : 1685-97

102. Grad I, Picard D. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol.* 2007; 275 : 2–12

103. Morimoto R, Fodor E. Cell-specific expression of heat shock proteins in chicken reticulocytes and lymphocytes. *J Cell Biol.* 1984; 99 : 1316–1323

104. 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 : 946–953

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

106. Mjehed H, Girodon F, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins in hematopoietic

malignancies. *Exp Cell Res.* 2012 Sep 10; 318(15) : 1946-58

107. De Maria, R. et al. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature.* 1999; 401, 489–493

108. Ribeil JA, Zermati Y, Vandekerckhove J, et al. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature.* 2007; 445 : 102–105

109. 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 : 5861–5871

110. Weiss MJ, Zhou S, Feng L, et al. Role of alpha hemoglobin-stabilizing protein in normal erythropoiesis and β -thalassemia. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1054 : 103–117

111. Arlet JB, Ribeil JA, Guillem F, Negre O, Hazoume A, Marcion G, Beuzard Y, Dussiot M, Moura IC, Demarest S, de Beauchêne IC, Belaid-Choucair Z, Sevin M, Maciel TT, Auclair C, Leboulch P, Chretien S, Tchertanov L, Baudin-Creuzat V, Seigneuric R, Fontenay M, Garrido C, Hermine O, Courtois G. HSP70 sequestration by free α -globin promotes ineffective erythropoiesis in β -thalassaemia. *Nature.* 2014 Oct 9; 514(7521) : 242-6

112. de Thonel A, Vandekerckhove J, Lanneau D, Selvakumar S, Courtois G, Hazoume A, Brunet M, Maurel S, Hammann A, Ribeil JA, Zermati Y, Gabet AS, Boyes J, Solary E, Hermine O, Garrido C. HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation. *Blood.* 2010 Jul 8; 116(1) : 85-96

113. Gurbuxani S, Schmitt E, Cande C, Parcellier A, Hammann A, Daugas E, Kouranti I, Spahr C, Pance A, Kroemer G, Garrido C. Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene.* 2003 Oct 2; 22(43) : 6669-78

114. Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, Goulding EH, Eddy EM. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 16; 93(8) : 3264-8

115. Guo F, Sigua C, Bali P, George P, Fiskus W, Scuto A, Annavarapu S, Mouttaki A, Sondarva G, Wei S, Wu J, Djeu J, Bhalla K. Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood.* 2005 Feb 1; 105(3) : 1246-55

116. Frisan E, Vandekerckhove J, de Thonel A, Pierre-Eugène C, Sternberg A, Arlet JB, Floquet C, Gyan E, Kosmider O, Dreyfus F, Gabet AS, Courtois G, Vyas P, Ribeil JA, Zermati Y, Lacombe C, Mayeux P, Solary E, Garrido C, Hermine O, Fontenay M. Defective nuclear localization of Hsp70 is associated with dyserythropoiesis and GATA-1 cleavage in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2012 Feb 9; 119(6) : 1532-42

117. Marubayashi S, Koppikar P, Taldone T, Abdel-Wahab O, West N, Bhagwat N, Caldas-Lopes E, Ross KN, Gönen M, Gozman A, Ahn JH, Rodina A, Ouerfelli O, Yang G, Hedvat C, Bradner JE, Chiosis G, Levine RL. HSP90 is a therapeutic target in JAK2-dependent myeloproliferative neoplasms in mice and humans. *J Clin Invest.* 2010 Oct; 120(10) : 3578-931

118. Cantor AB, Orkin SH. Transcriptional regulation of erythropoiesis : an affair involving multiple partners. *Oncogene.* 2002 May 13; 21(21) : 3368-76

119. Orkin SH. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood*. 1992; 80 : 575-581
120. Raich N, Romeo PH. Erythroid regulatory elements. *Stem Cells*. 1993; 11 : 95-104
121. Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol*. 2005 Feb; 25(4) : 1215-27
122. Shimizu R, Yamamoto M. Gene expression regulation and domain function of hematopoietic GATA factors. *Semin Cell Dev Biol*. 2005 Feb; 16(1) : 129-36
123. Crispino JD. GATA1 in normal and malignant hematopoiesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2005 Feb; 16(1) : 137-47
124. Laurent B, Randrianarison-Huetz V, Kadri Z, Romeo PH, Porteu F, Dumenil D. Gfi-1B promoter remains associated with active chromatin marks throughout erythroid differentiation of human primary progenitor cells. *Stem Cells*. 2009; 27 : 2153-2162
125. Gregory T, Yu C, Ma A, Orkin SH, Blobel GA, Weiss MJ. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood*. 1999 Jul 1; 94(1) : 87-96
126. Shimizu R, Yamamoto M. GATA-related hematologic disorders. *Exp Hematol*. 2016 Aug; 44(8) : 696-705
127. Tsang AP, Fujiwara Y, Hom DB, Orkin SH. Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev*. 1998; 12 : 1176-1188
128. Nichols KE, Crispino JD, Poncz M, et al. Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet*. 2000; 24 : 266-270
129. Stopka T, Amanatullah DF, Papetti M, Skoultschi AI. PU.1 inhibits the erythroid program by binding to GATA-1 on DNA and creating a repressive chromatin structure. *EMBO J*. 2005; 24 : 3712-3723
130. Warren AJ, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Smith AJ, Rabbitts TH. The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell*. 1994; 78 : 45-57
131. Love PE, Warzecha C, Li L. Ldb1 complexes : the new master regulators of erythroid gene transcription. *Trends Genet*. 2014 Jan; 30(1) : 1-9
132. Miller IJ, Bieker JJ. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins. *Mol Cell Biol*. 1993; 13 : 2776-2786
133. Orkin SH, Kazazian HH, Jr., Antonarakis SE, et al. Linkage of beta-thalassaemia mutations and beta-globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human beta-globin gene cluster. *Nature*. 1982; 296 : 627-631
134. Shivdasani RA, Rosenblatt MF, Zucker-Franklin D, Jackson CW, Hunt P, Saris CJ, Orkin SH. Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell*. 1995 Jun 2; 81(5) : 695-704

135. Drissen R, Palstra RJ, Gillemans N, et al. The active spatial organization of the beta-globin locus requires the transcription factor EKLF. *Genes Dev.* 2004; 18 : 2485-2490
136. Anderson KE, Sassa, S., Bishop, D.F., Desnick, R.J. Disorders of heme biosynthesis : X-linked sideroblastic anemia and the porphyrias. 8th edn. Mc Graw-Hill, NY.2010.
137. Tsiftoglou AS, Tsamadou AI, Papadopoulou LC. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions : molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacol Ther.* 2006 Aug; 111(2) : 327-45
138. Thomas Briggs, Albert M. Chandler *Biochemistry* 1995
139. Smith AG, Raven EL, Chernova T. The regulatory role of heme in neurons. *Metallomics.* 2011 Oct; 3(10) : 955-62
140. Chiabrando D, Mercurio S, Tolosano E. Heme and erythropoiesis : more than a structural role. *Haematologica.* 2014 Jun; 99(6) : 973-83
141. Sinclair J, Hamza I. A novel heme-responsive element mediates transcriptional regulation in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem.* 2010 Dec 10; 285(50) : 39536-43
142. Chen JJ. Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2alpha kinase : relevance to anemias. *Blood.* 2007 Apr 1; 109(7) : 2693-9
143. Barr I, Smith AT, Chen Y, Senturia R, Burstyn JN, Guo F. Ferric, not ferrous, heme activates RNA-binding protein DGCR8 for primary microRNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Feb 7; 109(6) : 1919-24
144. Shemin, D., and Rittenberg, D. The Utilization of Glycine for the Synthesis of a Porphyrin. *J. Biol. Chem.* 1945. 159, 567-568
145. Neuberger et al. Aminolevulinic acid and porphyrin synthesis. *Nature* 172 : 1093, 1953
146. Sadlon TJ, Dell'Oso T, Surinya KH, May BK. Regulation of erythroid 5-aminolevulinic synthase expression during erythropoiesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999 Oct; 31(10) : 1153-67
147. Chiabrando D, Vinchi F, Fiorito V, Mercurio S, Tolosano E. Heme in pathophysiology : a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Front Pharmacol.* 2014 Apr 8; 5 : 61
148. Morello N, Bianchi FT, Marmiroli P, Tonoli E, Rodriguez Menendez V, Silengo L, Cavaletti G, Vercelli A, Altruda F, Tolosano E. A role for hemopexin in oligodendrocyte differentiation and myelin formation. *PLoS One.* 2011; 6(5) : e20173
149. Bakker WW, Melgert BN, Faas MM. Hemopexin : anti-inflammatory, pro-inflammatory, or both? *J Leukoc Biol.* 2010 Jan; 87(1) : 1-2
150. Fink MP. Editorial : Hemopexin : newest member of the anti-inflammatory mediator club. *J Leukoc Biol.* 2009 Aug; 86(2) : 203-4
151. Delanghe JR, Langlois MR. Hemopexin : a review of biological aspects and the role in laboratory medicine. *Clin Chim Acta.* 2001 Oct; 312(1-2) : 13-23

152. Hvidberg V., Maniecki M. B., Jacobsen C., Hojrup P., Moller H. J., Moestrup S. K. (2005). Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood* 106, 2572–2579
153. N. Shipulina, A. Smith, W.T. Morgan, Heme binding by hemopexin : evidence for multiple modes of binding and functional implications, *J. Protein Chem.* 19 (2000) 239–248
154. Kumar S., Bandyopadhyay U. (2005). Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol. Lett.* 157, 175–188 10.1016
155. Zhan B, Perally S, Brophy PM, Xue J, Goud G, Liu S, Deumic V, de Oliveira LM, Bethony J, Bottazzi ME, Jiang D, Gillespie P, Xiao SH, Gupta R, Loukas A, Ranjit N, Lustigman S, Oksov Y, Hotez P. Molecular cloning, biochemical characterization, and partial protective immunity of the heme-binding glutathione S-transferases from the human hookworm *Necator americanus*. *Infect Immun.* 2010 Apr; 78(4) : 1552-63
156. S.-I. Iwahara, H. Satoh, D.-X. Song, J. Webb, A.L. Burlingame, Y. Nagae, U. Muller-Eberhard, Purification, characterization, and cloning of a heme-binding protein (23 kDa) in rat liver cytosol, *Biochemistry* 34 (1995) 13398–13406
157. Immenschuh S, Stritzke J, Iwahara S, Ramadori G. Up-regulation of heme-binding protein 23 (HBP23) gene expression by lipopolysaccharide is mediated via a nitric oxide-dependent signaling pathway in rat Kupffer cells. *Hepatology.* 1999 Jul; 30(1) : 118-27
158. Hannibal L, Collins D, Brassard J, Chakravarti R, Vempati R, Dorlet P, Santolini J, Dawson JH, Stuehr DJ. Heme binding properties of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry.* 2012 Oct 30; 51(43) : 8514-29
159. Chakravarti R, Aulak KS, Fox PL, Stuehr DJ. GAPDH regulates cellular heme insertion into inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Oct 19; 107(42) : 18004-9
160. Ghosh A, Chawla-Sarkar M, Stuehr DJ. Hsp90 interacts with inducible NO synthase client protein in its heme-free state and then drives heme insertion by an ATP-dependent process. *FASEB J.* 2011 Jun; 25(6) : 2049-60
161. Rajagopal A, Rao AU, Amigo J, Tian M, Upadhyay SK, Hall C, Uhm S, Mathew MK, Fleming MD, Paw BH, Krause M, Hamza I. Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. *Nature.* 2008 Jun 19; 453(7198) : 1127-31
162. White C, Yuan X, Schmidt PJ, Bresciani E, Samuel TK, Campagna D, Hall C, Bishop K, Calicchio ML, Lapierre A, Ward DM, Liu P, Fleming MD, Hamza I. HRG1 is essential for heme transport from the phagolysosome of macrophages during erythrophagocytosis. *Cell Metab.* 2013 Feb 5; 17(2) : 261-70
163. Le Blanc S, Garrick MD, Arredondo M. Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012 Jun 15; 302(12) : C17805
164. Laftah AH, Latunde-Dada GO, Fakhri S, Hider RC, Simpson RJ, McKie AT. Haem and folate transport by proton-coupled folate transporter/haem carrier protein 1 (SLC46A1). *Br J Nutr.* 2009 Apr; 101(8) : 1150-6
165. Duffy, S. P., Shing, J., Saraon, P., Berger, L. C., Eiden, M. V., Wilde, A., et al. (2010). The Fowler syndrome-associated protein FLVCR2 is an importer of heme. *Mol. Cell. Biol.* 30, 5318–5324

166. Krishnamurthy, P. C., Du, G., Fukuda, Y., Sun, D., Sampath, J., Mercer, K. E., et al. (2006). Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter. *Nature* 443, 586–589
167. Desuzinges-Mandon, E., Arnaud, O., Martinez, L., Huche, F., Di Pietro, A., and Falson, P. (2010). ABCG2 transports and transfers heme to albumin through its large extracellular loop. *J. Biol. Chem.* 285, 33123–33133
168. Zelinski T, Coghlan G, Liu XQ, Reid ME. ABCG2 null alleles define the Jr(a-) blood group phenotype. *Nat Genet.* 2012 Jan 15; 44(2) : 131-2
169. Quigley, J. G., Yang, Z., Worthington, M. T., Phillips, J. D., Sabo, K. M., Sabath, D. E., et al. (2004). Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell* 118, 757–766
170. Keel, S. B., Doty, R. T., Yang, Z., Quigley, J. G., Chen, J., Knoblauch, S., et al. (2008). A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science* 319, 825–828
171. Yang, Z., Philips, J. D., Doty, R. T., Giraudi, P., Ostrow, J. D., Tiribelli, C., et al. (2010). Kinetics and specificity of feline leukemia virus subgroup C receptor (FLVCR) export function and its dependence on hemopexin. *J. Biol. Chem.* 285, 28874–28882
172. Alves LR, Costa ES, Sorgine MH, Nascimento-Silva MC, Teodosio C, Bárcena P, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Orfao A, Oliveira PL, Maya-Monteiro CM. Heme-oxygenases during erythropoiesis in K562 and human bone marrow cells. *PLoS One.* 2011; 6(7) : e21358
173. Chiabrando, D., Marro, S., Mercurio, S., Giorgi, C., Petrillo, S., Vinchi, F., et al. (2012). The mitochondrial heme exporter FLVCR1b mediates erythroid differentiation. *J. Clin. Invest.* 122, 4569–4579
174. Tailor, C. S., Willett, B. J., and Kabat, D. (1999). A putative cell surface receptor for anemia-inducing feline leukemia virus subgroup C is a member of a transporter superfamily. *J. Virol.* 73, 6500–6505
175. Rajadhyaksha, A. M., Elemento, O., Puffenberger, E. G., Schierberl, K. C., Xiang, J. Z., Putorti, M. L., et al. (2010). Mutations in FLVCR1 cause posterior column ataxia and retinitis pigmentosa. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 643–654
176. Ishiura, H., Fukuda, Y., Mitsui, J., Nakahara, Y., Ahsan, B., Takahashi, Y., et al. (2011). Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa in a Japanese family with a novel mutation in FLVCR1. *Neurogenetics* 12, 117–121
177. Yanatori, I., Yasui, Y., Miura, K., and Kishi, F. (2012). Mutations of FLVCR1 in posterior column ataxia and retinitis pigmentosa result in the loss of heme export activity. *Blood Cells Mol. Dis.* 49, 60–66
178. Rey MA, Duffy SP, Brown JK, Kennedy JA, Dick JE, Dror Y, Tailor CS. Enhanced alternative splicing of the FLVCR1 gene in Diamond Blackfan anemia disrupts FLVCR1 expression and function that are critical for erythropoiesis. *Haematologica.* 2008 Nov; 93(11) : 1617-26
179. Khan AA, Quigley JG. Control of intracellular heme levels : heme transporters and heme oxygenases. *Biochim Biophys Acta.* 2011 May; 1813(5) : 668-82

180. Yoshida T, Migita CT. Mechanism of heme degradation by heme oxygenase. *J Inorg Biochem.* 2000 Nov; 82(1-4) : 33-41
181. Furuyama K, Kaneko K, Vargas PD. Heme as a magnificent molecule with multiple missions : heme determines its own fate and governs cellular homeostasis. *Tohoku J Exp Med.* 2007 Sep; 213(1) : 1-16
182. Saïd Lyoumi, Fabienne Tamion, Antony Leplingard, Carole Beaumont, Hervé Puy, Jean-Pierre Lebreton. Rôles protecteurs de l'hème oxygénase et des catabolites de l'hème. Volume 13, numéro 4, Juillet-Août 2007 *Hématologie*
183. Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH. Carbon monoxide : a putative neural messenger. *Science.* 1993 Jan 15; 259(5093) : 381-4. Erratum in : *Science* 1994 Jan 7; 263(5143) : 15
184. West AP Jr, Bennett MJ, Sellers VM, Andrews NC, Enns CA, Bjorkman PJ. Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and the hereditary hemochromatosis protein HFE. *J Biol Chem.* 2000 Dec 8; 275(49) : 38135-8
185. Wang J, Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J.* 2011 Mar 15; 434(3) : 365-81
186. Ponka P. Cellular iron metabolism. *Kidney Int Suppl.* 1999 Mar; 69 : S2-11
187. Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, Antiochos B, McDonald A, Chen J, Sharp JJ, Fujiwara Y, Barker JE, Fleming MD. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet.* 2005 Nov; 37(11) : 1264-9
188. Gunshin H, Fujiwara Y, Custodio AO, Drenzo C, Robine S, Andrews NC. Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *J Clin Invest.* 2005 May; 115(5) : 1258-66
189. Sheftel AD, Zhang AS, Brown C, Shirihai OS, Ponka P. Direct interorganellar transfer of iron from endosome to mitochondrion. *Blood.* 2007 Jul 1; 110(1) : 125-32
190. Nilsson R, Schultz IJ, Pierce EL, Soltis KA, Naranuntarat A, Ward DM, Baughman JM, Paradkar PN, Kingsley PD, Culotta VC, Kaplan J, Palis J, Paw BH, Mootha VK. Discovery of genes essential for heme biosynthesis through large-scale gene expression analysis. *Cell Metab.* 2009 Aug; 10(2) : 119-30
191. Breuer W, Hershko C, Cabantchik ZI. The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism. *Transfus Sci.* 2000 Dec; 23(3) : 185-92
192. Zhang DL, Hughes RM, Ollivierre-Wilson H, Ghosh MC, Rouault TA. A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression. *Cell Metab.* 2009 May; 9(5) : 461-73
193. Tandara L, Salamunic I. Iron metabolism : current facts and future directions. *Biochem Med (Zagreb).* 2012; 22(3) : 311-28
194. Sheftel A, Stehling O, Lill R. Iron-sulfur proteins in health and disease. *Trends Endocrinol Metab.* 2010 May; 21(5) : 302-14
195. Munakata H, Sun JY, Yoshida K, Nakatani T, Honda E, Hayakawa S, Furuyama K, Hayashi N. Role of the heme regulatory motif in the heme-mediated inhibition of mitochondrial import of 5-aminolevulinic synthase. *J Biochem.* 2004 Aug; 136(2) : 233-8

196. Sinclair J, Hamza I. A novel heme-responsive element mediates transcriptional regulation in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*. 2010 Dec 10; 285(50) : 39536-43
197. Kramer MF, Gunaratne P, Ferreira GC. Transcriptional regulation of the murine erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase gene. *Gene*. 2000 Apr 18; 247(1-2) : 153-66
198. 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 Nov 5; 324(1) : 77-85
199. Tahara T, Sun J, Nakanishi K, Yamamoto M, Mori H, Saito T, Fujita H, Igarashi K, Taketani S. 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 Feb 13; 279(7) : 5480-7
200. Suzuki H, Tashiro S, Hira S, Sun J, Yamazaki C, Zenke Y, et al. Heme regulates gene expression by triggering Crml-dependent nuclear export of Bach1. *EMBO J* 2004; 23(13) : 2544-53
201. Zenke-Kawasaki Y, Dohi Y, Katoh Y, Ikura T, Ikura M, Asahara T, et al. Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor Bach1. *Mol Cell Biol* 2007; 27(19) : 6962-71
202. Nguyen T, Yang CS, Pickett CB. The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(4) : 433-41
203. Egger AL, Liu G, Pezzuto JM, van Breemen RB, Mesecar AD. Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(29) : 10070-5
204. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236(2) : 313-22
205. Crosby JS, Lee K, London IM, Chen JJ. Erythroid expression of the heme-regulated eIF-2 alpha kinase. *Mol Cell Biol* 1994; 14(6) : 3906-14
206. Josephs H.W.(1936). *Anaemia of infancy and early childhood* Medicine (Baltimore), 15
207. Diamond LK, Blackfan KD. Hypoplastic anemia. *Am J Dis Child*. 1938; 56 : 464
208. Narla A, Vlachos A, Nathan DG. Diamond Blackfan Anemia Treatment : Past, Present, and Future. *Seminars in hematology*. 2011; 48(2) : 117-123
209. Costa LD, Moniz H, Simansour M, Tchernia G, Mohandas N, Leblanc T. Diamond-Blackfan anemia, ribosome and erythropoiesis. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine*. 2010; 17(3) : 112-119
210. Clinton C, Gazda HT, Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Fong CT, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, editors. *Diamond-Blackfan Anemia*. GeneReviews® 2016
211. Willig TN, Niemeyer CM, Leblanc T, et al. Identification of new prognosis factors from the clinical and epidemiologic analysis of a registry of 229 Diamond-Blackfan anemia patients. DBA group of Societe d'Hematologie et d'Immunologie Pediatrique (SHIP), Gesellschaft fur Padiatrische Onkologie und Hamatologie (GPOH), and the European Society for Pediatric Hematology and Immunology (ESPHI). *Pediatr Res*. 1999; 46 : 553-561

212. Lipton JM, Atsidaftos E, Zyskind I, Vlachos A. Improving clinical care and elucidating the pathophysiology of Diamond Blackfan anemia : an update from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Pediatr Blood Cancer*. 2006; 46 : 558-564
213. Lipton JM, Ellis SR. Diamond-Blackfan anemia : diagnosis, treatment, and molecular pathogenesis. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009; 23 : 261-282
214. Vlachos A, Klein GW, Lipton JM. The Diamond Blackfan Anemia Registry : tool for investigating the epidemiology and biology of Diamond-Blackfan anemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2001; 23 : 377-382
215. Orfali KA, Ohene-Abuakwa Y, Ball SE. Diamond Blackfan anaemia in the UK : clinical and genetic heterogeneity. *Br J Haematol*. 2004; 125 : 243-252
216. Diamond LK, Wang WC, Alter BP. Congenital hypoplastic anemia. *Adv Pediatr*. 1976; 22 : 349-378
217. Fargo JH, Kratz CP, Giri N, Savage SA, Wong C, Backer K, Alter BP, Glader B. Erythrocyte adenosine deaminase : diagnostic value for Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*. 2013 Feb; 160(4) : 547-54
218. Halperin DS, Freedman MH. Diamond-blackfan anemia : etiology, pathophysiology, and treatment. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1989 Winter; 11(4) : 380-94
219. Glader BE, Backer K. Elevated red cell adenosine deaminase activity : a marker of disordered erythropoiesis in Diamond-Blackfan anaemia and other haematologic diseases. *Br J Haematol*. 1988; 68 : 165-168
220. Willig TN, Perignon JL, Gustavsson P, et al. High adenosine deaminase level among healthy probands of Diamond Blackfan anemia (DBA) cosegregates with the DBA gene region on chromosome 19q13. The DBA Working Group of Societe d'Immunologie Pediatrique (SHIP). *Blood*. 1998; 92 : 4422-4427
221. Vlachos A, Ball S, Dahl N, et al. Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia : results of an international clinical consensus conference. *Br J Haematol*. 2008; 142 : 859-876
209. Perdahl EB, Naprstek BL, Wallace WC, Lipton JM. Erythroid failure in Diamond-Blackfan anemia is characterized by apoptosis. *Blood*. 1994 Feb 1; 83(3) : 645-50
210. Boulwood J, Pellagatti A, Wainscoat JS. Haploinsufficiency of ribosomal proteins and p53 activation in anemia : Diamond-Blackfan anemia and the 5q- syndrome. *Adv Biol Regul*. 2012 Jan; 52(1) : 196-203
211. Danilova N, Bibikova E, Covey TM, Nathanson D, Dimitrova E, Konto Y, Lindgren A, Glader B, Radu CG, Sakamoto KM, Lin S. The role of the DNA damage response in zebrafish and cellular models of Diamond Blackfan anemia. *Dis Model Mech*. 2014 Jul; 7(7) : 895-905
212. Dutt S, Narla A, Lin K, Mullally A, Abayasekara N, Megerdichian C, Wilson FH, Currie T, Khanna-Gupta A, Berliner N, Kutok JL, Ebert BL. Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood*. 2011 Mar 3; 117(9) : 2567-76
213. Moniz H, Gastou M, Leblanc T, et al. Primary hematopoietic cells from DBA patients

- with mutations in RPL11 and RPS19 genes exhibit distinct erythroid phenotype in vitro. *Cell Death & Disease*. 2012; 3(7) : e356
214. Wessely O, Deiner EM, Beug H, von Lindern M. The glucocorticoid receptor is a key regulator of the decision between self-renewal and differentiation in erythroid progenitors. *EMBO J*. 1997; 16 : 267-280
215. von Lindern M, Zauner W, Mellitzer G, Steinlein P, Fritsch G, Huber K, Löwenberg B, Beug H. The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-Kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors in vitro. *Blood*. 1999 Jul 15; 94(2) : 550-9
216. Bauer A, Tronche F, Wessely O, et al. The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis. *Genes & Development*. 1999; 13(22) : 2996-3002
217. Sengupta S, Wasylyk B. Ligand-dependent interaction of the glucocorticoid receptor with p53 enhances their degradation by HDM2. *Genes Dev*. 2001; 15 : 2367-2380
218. Sjögren SE, Siva K, Soneji S, George AJ, Winkler M, Jaako P, Wlodarski M, Karlsson S, Hannan RD, Flygare J. Glucocorticoids improve erythroid progenitor maintenance and dampen Trp53 response in a mouse model of Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*. 2015 Nov; 171(4) : 517-29
219. Iskander D, Psaila B, Gerrard G, Chaidos A, En Foong H, Harrington Y, Karnik LC, Roberts I, de la Fuente J, Karadimitris A. Elucidation of the EP defect in Diamond-Blackfan anemia by characterization and prospective isolation of human EPs. *Blood*. 2015 Apr 16; 125(16) : 2553-7
220. Kellendonk C, Tronche F, Reichardt HM, Schutz G. Mutagenesis of the glucocorticoid receptor in mice. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1999; 69 : 253-259
221. Zhang L, Prak L, Rayon-Estrada V, Thiru P, Flygare J, Lim B, Lodish HF. ZFP36L2 is required for self-renewal of early burst-forming unit erythroid progenitors. *Nature*. 2013 Jul 4; 499(7456) : 92-6
222. Barnes PJ. How corticosteroids control inflammation : Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol*. 2006 Jun; 148(3) : 245-54
223. Peffault de Latour R, Peters C, Gibson B, Strahm B, Lankester A, de Heredia CD, Longoni D, Fioredda F, Locatelli F, Yaniv I, Wachowiak J, Donadieu J, Lawitschka A, Bierings M, Wlodarski M, Corbacioglu S, Bonanomi S, Samarasinghe S, Leblanc T, Dufour C, Dalle JH; Pediatric Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation; Severe Aplastic Anemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Recommendations on hematopoietic stem cell transplantation for inherited bone marrow failure syndromes. *Bone Marrow Transplant*. 2015 Sep; 50(9) : 1168-72
224. Abkowitz JL, Schaison G, Boulad F, et al. Response of Diamond-Blackfan anemia to metoclopramide : evidence for a role for prolactin in erythropoiesis. *Blood*. 2002; 100 : 2687-2691
225. Akiyama M, Yanagisawa T, Yuza Y, et al. Successful treatment of Diamond-Blackfan anemia with metoclopramide. *Am J Hematol*. 2005; 78 : 295-298

226. Malbora B, Avcı Z, Ozbek N. Successful treatment of refractory diamond-blackfan anemia using metoclopramide and prednisolone. *Turk J Haematol.* 2012 Jun; 29(2) : 191-2
227. Leblanc TM, Da Costa L, Marie I, Demolis P, Tchernia G. Metoclopramide treatment in DBA patients : no complete response in a French prospective study. *Blood.* 2007; 109 : 2266-2267
228. Ball SE, Tchernia G, Wranne L, et al. Is there a role for interleukin-3 in Diamond-Blackfan anaemia? Results of a European multicentre study. *Br J Haematol.* 1995; 91 : 313-318
229. El-Beshlawy A, Ibrahim IY, Rizk S, Eid K. Study of 22 Egyptian patients with Diamond-Blackfan anemia, corticosteroids, and cyclosporin therapy results. *Pediatrics.* 2002; 110 : e44
230. Jabr FI, Aoun E, Azar C, Taher A. Diamond-Blackfan anemia responding to valproic acid. *Blood.* 2004; 104 : 3415
231. Morimoto A, Kuriyama K, Tsuji K, et al. Use of rituximab to treat refractory Diamond-Blackfan anemia. *Eur J Haematol.* 2005; 74 : 442-444
232. Cmejlova J, Dolezalova L, Pospisilova D, Petrtylova K, Petrak J, Cmejla R. Translational efficiency in patients with Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica.* 2006; 91 : 1456-1464
233. Pospisilova D, Cmejlova J, Hak J, Adam T, Cmejla R. Successful treatment of a Diamond-Blackfan anemia patient with amino acid leucine. *Haematologica.* 2007; 92 : e66-67
234. Narla A, Payne EM, Abayasekara N, Hurst SN, Raiser DM, Look AT, Berliner N, Ebert BL, Khanna-Gupta A. L-Leucine improves the anaemia in models of Diamond Blackfan anaemia and the 5q- syndrome in a TP53-independent way. *Br J Haematol.* 2014 Nov; 167(4) : 524-8
235. Hamaguchi I, Flygare J, Nishiura H, et al. Proliferation deficiency of multipotent hematopoietic progenitors in ribosomal protein S19 (RPS19)-deficient diamond-Blackfan anemia improves following RPS19 gene transfer. *Mol Ther.* 2003; 7 : 613-622
236. Flygare J, Olsson K, Richter J, Karlsson S. Gene therapy of Diamond Blackfan anemia CD34(+) cells leads to improved erythroid development and engraftment following transplantation. *Exp Hematol.* 2008; 36 : 1428-1435
237. Jaako P, Debnath S, Olsson K, Modlich U, Rothe M, Schambach A, Flygare J, Karlsson S. Gene therapy cures the anemia and lethal bone marrow failure in a mouse model of RPS19-deficient Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica.* 2014 Dec; 99(12) : 1792-8
238. Vlachos A, Rosenberg PS, Atsidaftos E, Alter BP, Lipton JM. Incidence of neoplasia in Diamond Blackfan anemia : a report from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Blood.* 2012 Apr 19; 119(16) : 3815-9
239. Faivre L, Meerpohl J, Da Costa L, et al. High-risk pregnancies in Diamond-Blackfan anemia : a survey of 64 pregnancies from the French and German registries. *Haematologica.* 2006; 91 : 530-533
240. Draptchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B, Pettersson M, Willig TN, Dianzani I,

- Ball S, Tchernia G, Klar J, Matsson H, Tentler D, Mohandas N, Carlsson B, Dahl N. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet.* 1999 Feb; 21(2) : 169-75
241. Quarello P, Garelli E, Brusco A, Carando A, Mancini C, Pappi P, Vinti L, Svahn J, Dianzani I, Ramenghi U. High frequency of ribosomal protein gene deletions in Italian Diamond-Blackfan anemia patients detected by multiplex ligation-dependent probe amplification assay. *Haematologica.* 2012 Dec; 97(12) : 1813-7
242. Doherty L, Sheen MR, Vlachos A, et al. Ribosomal protein genes RPS10 and RPS26 are commonly mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Am J Hum Genet.* 2010; 86 : 222-228-330.
243. Quarello P, Garelli E, Carando A, et al. Diamond-Blackfan anemia : genotype-phenotype correlations in Italian patients with RPL5 and RPL11 mutations. *Haematologica.* 2010; 95 : 206-213
244. Aguisa-Touré AH, Da Costa L, Leblanc T, Tchernia G, Fribourg S, Gleizes PE. [Diamond-Blackfan anemia reveals the dark side of ribosome biogenesis]. *Med Sci (Paris).* 2009 Jan; 25(1) : 69-76
245. Gazda HT, Sheen MR, Vlachos A, et al. Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet.* 2008; 83 : 769-780.
246. Cmejla R, Cmejlova J, Handrkova H, et al. Identification of mutations in the ribosomal protein L5 (RPL5) and ribosomal protein L11 (RPL11) genes in Czech patients with Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat.* 2009; 30 : 321-327
247. Gripp KW, Curry C, Olney AH, Sandoval C, Fisher J, Chong JX; UW Center for Mendelian Genomics, Pilchman L, Sahraoui R, Stabley DL, Sol-Church K. Diamond-Blackfan anemia with mandibulofacial dystostosis is heterogeneous, including the novel DBA genes TSR2 and RPS28. *Am J Med Genet A.* 2014 Sep; 164A(9) : 2240-9
248. Sankaran VG, Ghazvinian R, Do R, Thiru P, Vergilio JA, Beggs AH, Sieff CA, Orkin SH, Nathan DG, Lander ES, Gazda HT. Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. *J Clin Invest.* 2012 Jul; 122(7) : 2439-43
249. Parrella S, Aspesi A, Quarello P, Garelli E, Pavesi E, Carando A, Nardi M, Ellis SR, Ramenghi U, Dianzani I. Loss of GATA-1 full length as a cause of Diamond-Blackfan anemia phenotype. *Pediatr Blood Cancer.* 2014 Jul; 61(7) : 1319-21
250. Ludwig LS, Gazda HT, Eng JC, Eichhorn SW, Thiru P, Ghazvinian R, George TI, Gotlib JR, Beggs AH, Sieff CA, Lodish HF, Lander ES, Sankaran VG. Altered translation of GATA1 in Diamond-Blackfan anemia. *Nat Med.* 2014 Jul; 20(7) : 748-53
251. Klar J, Khalfallah A, Arzoo PS, Gazda HT, Dahl N. Recurrent GATA1 mutations in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol.* 2014 Sep; 166(6) : 949-51
252. Andersson S, Saeboe-Larsen S, Lambertsson A, Merriam J, Jacobs-Lorena M. A *Drosophila* third chromosome Minute locus encodes a ribosomal protein. *Genetics.* 1994; 137 : 513-520
253. Lambertsson A. The minute genes in *Drosophila* and their molecular functions. *Adv Genet.* 1998; 38 : 69-134

254. Jason Fixler, N. Mohandas, travaux non publiés, communication personnelle
255. Gazda HT, Zhong R, Long L, et al. RNA and protein evidence for haplo-insufficiency in Diamond-Blackfan anaemia patients with RPS19 mutations. *Br J Haematol.* 2004; 127 : 105-113
256. Matsson H, Davey EJ, Draptchinskaia N, et al. Targeted disruption of the ribosomal protein S19 gene is lethal prior to implantation. *Mol Cell Biol.* 2004; 24 : 4032-4037
257. Devlin EE, Dacosta L, Mohandas N, Elliott G, Bodine DM. A transgenic mouse model demonstrates a dominant negative effect of a point mutation in the RPS19 gene associated with Diamond-Blackfan anemia. *Blood.* 2010; 116 : 2826-2835
258. McGowan KA, Li JZ, Park CY, et al. Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects. *Nat Genet.* 2008; 40 : 963-970
259. Watkins-Chow DE, Cooke J, Pidsley R, Edwards A, Slotkin R, Leeds KE, Mullen R, Baxter LL, Campbell TG, Salzer MC, Biondini L, Gibney G, Phan Dinh Tuy F, Chelly J, Morris HD, Riegler J, Lythgoe MF, Arkeel RM, Loreni F, Flint J, Pavan WJ, Keays DA. Mutation of the diamond-blackfan anemia gene *Rps7* in mouse results in morphological and neuroanatomical phenotypes. *PLoS Genet.* 2013; 9(1) : e1003094
260. Morgado-Palacin L, Varetti G, Llanos S, Gómez-López G, Martínez D, Serrano M. Partial Loss of *Rpl11* in Adult Mice Recapitulates Diamond-Blackfan Anemia and Promotes Lymphomagenesis. *Cell Rep.* 2015 Oct 27; 13(4) : 712-22
261. Sieff CA, Yang J, Merida-Long LB, Lodish HF. Pathogenesis of the erythroid failure in Diamond Blackfan anaemia. *Br J Haematol.* 2010 Feb; 148(4) : 611-22
262. An X, Schulz VP, Mohandas N, Gallagher PG. Human and murine erythropoiesis. *Curr Opin Hematol.* 2015 May; 22(3) : 206-11
263. Danilova N, Sakamoto KM, Lin S. Ribosomal protein S19 deficiency in zebrafish leads to developmental abnormalities and defective erythropoiesis through activation of p53 protein family. *Blood.* 2008; 112 : 5228-5237
264. Uechi T, Nakajima Y, Chakraborty A, Torihara H, Higa S, Kenmochi N. Deficiency of ribosomal protein S19 during early embryogenesis leads to reduction of erythrocytes in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mol Genet.* 2008; 17 : 3204-3211
265. Danilova N, Sakamoto KM, Lin S. Ribosomal protein L11 mutation in zebrafish leads to haematopoietic and metabolic defects. *Br J Haematol.* 2011; 152 : 217-228
266. Duan J, Ba Q, Wang Z, et al. Knockdown of ribosomal protein S7 causes developmental abnormalities via p53 dependent and independent pathways in zebrafish. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011; 43 : 1218-1227
267. Abkowitz JL, Holly RD, Grant CK. Retrovirus-induced feline pure red cell aplasia. Hematopoietic progenitors are infected with feline leukemia virus and erythroid burst-forming cells are uniquely sensitive to heterologous complement. *J Clin Invest.* 1987 Oct; 80(4) : 1056-63
268. Chakraborty A, Uechi T, Higa S, Torihara H, Kenmochi N. Loss of ribosomal protein L11 affects zebrafish embryonic development through a p53-dependent apoptotic response. *PLoS One.* 2009; 4(1) : e4152

269. Ohene-Abuakwa Y, Orfali KA, Marius C, Ball SE. Two-phase culture in Diamond Blackfan Anemia : localization of erythroid defect. *Blood*. 2005; 105 : 838–846
270. Lipton JM, Kudisch M, Gross R, Nathan DG. Defective erythroid progenitor differentiation system in congenital hypoplastic (Diamond-Blackfan) anemia. *Blood*. 1986; 67 : 962-968
271. Tsai PH, Arkin S, Lipton JM. An intrinsic progenitor defect in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*. 1989; 73 : 112-120
272. Hamaguchi I, Ooka A, Brun A, et al. Gene transfer improves erythroid development in ribosomal protein S19-deficient Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 2002; 100 : 2724–31
273. Casadevall N, Croisille L, Auffray I, Tchernia G, Coulombel L. Age-related alterations in erythroid and granulopoietic progenitors in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*. 1994; 87 : 369-375
274. McGuckin CP, Ball SE, Gordon-Smith EC. Diamond-Blackfan anaemia : three patterns of in vitro response to haemopoietic growth factors. *Br J Haematol*. 1995; 89 : 457-464
275. Santucci MA, Bagnara GP, Strippoli P, et al. Long-term bone marrow cultures in Diamond-Blackfan anemia reveal a defect of both granulomacrophage and erythroid progenitors. *Exp Hematol*. 1999; 27 : 9-18
276. Bonsi L, Bagnara GP, Strippoli P, et al. M-07e cell bioassay detects stromal cell production of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and stem cell factor in normal and in Diamond-Blackfan anemia bone marrow. *Stem Cells*. 1993; 11 Suppl 2 : 131-134
277. Sieff CA, Yokoyama CT, Zsebo KM, Trammell J, Andersen JW, Nathan DG, Williams DA. The production of steel factor mRNA in Diamond-Blackfan anaemia long-term cultures and interactions of steel factor with erythropoietin and interleukin-3. *Br J Haematol*. 1992 Dec; 82(4) : 640-7
278. Olivieri NF, Grunberger T, Ben-David Y, Ng J, Williams DE, Lyman S, Anderson DM, Axelrad AA, Correa P, Bernstein A, et al. Diamond-Blackfan anemia : heterogenous response of hematopoietic progenitor cells in vitro to the protein product of the steel locus. *Blood*. 1991 Nov 1; 78(9) : 2211-5
279. Abkowitz JL, Sabo KM, Nakamoto B, Blau CA, Martin FH, Zsebo KM, Papayannopoulou T. Diamond-blackfan anemia : in vitro response of erythroid progenitors to the ligand for c-kit. *Blood*. 1991 Nov 1; 78(9) : 2198-202
280. Freedman MH, Amato D, Saunders EF. Erythroid colony growth in congenital hypoplastic anemia. *J Clin Invest*. 1976; 57 : 673-677
281. Halperin DS, Freedman MH. Diamond-blackfan anemia : etiology, pathophysiology, and treatment. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1989 Winter; 11(4) : 380-94
282. Kalmanti M, Kalmantis T, Dimitriou H, Kattamis C. Correlation of in vitro enhancement of erythropoiesis and clinical response to steroids in Diamond-Blackfan anaemia. *Haematologia (Budap)*. 1993; 25 : 263-269
283. Pospisilova D, Holub D, Zidova Z, Sulovska L, Houda J, Mihal V, Hadacova I, Radova

- L, Dzubak P, Hajdich M, et al. Heparin levels in Diamond-Blackfan anemia reflect erythropoietic activity and transfusion dependency. *Haematologica*. 2014 Jul; 99(7) : e118-21
284. Gazda HT, Sieff CA. Recent insights into the pathogenesis of Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*. 2006 Oct; 135(2) : 149-57
285. Dianzani I, Garelli E, Ramenghi U. Diamond-Blackfan anemia : a congenital defect in erythropoiesis. *Haematologica*. 1996 Nov-Dec; 81(6) : 560-72
286. Ge J, Apicella M, Mills JA, Garçon L, French DL, Weiss MJ, Bessler M, Mason PJ. Dysregulation of the Transforming Growth Factor β Pathway in Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Patients with Diamond Blackfan Anemia. *PLoS One*. 2015 Aug 10; 10(8) : e0134878
287. Rörby E, Hägerström MN, Blank U, Karlsson G, Karlsson S. Human hematopoietic stem/progenitor cells overexpressing Smad4 exhibit impaired reconstitution potential in vivo. *Blood*. 2012 Nov 22; 120(22) : 4343-51
288. Miyake K, Utsugisawa T, Flygare J, et al. Ribosomal protein S19 deficiency leads to reduced proliferation and increased apoptosis but does not affect terminal erythroid differentiation in a cell line model of Diamond-Blackfan anemia. *Stem Cells*. 2008; 26 : 323-329
289. Farrar JE, Nater M, Caywood E, McDevitt MA, Kowalski J, Takemoto CM, Talbot CC Jr, Meltzer P, Esposito D, Beggs AH, et al. Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, Rpl35a, in Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 2008 Sep 1; 112(5) : 1582-92
290. Antunes AT, Goos YJ, Pereboom TC, Hermkens D, Wlodarski MW, Da Costa L, MacInnes AW. Ribosomal Protein Mutations Result in Constitutive p53 Protein Degradation through Impairment of the AKT Pathway. *PLoS Genet*. 2015 Jul 1; 11(7) : e1005326
291. Gazda HT, Preti M, Sheen MR, O'Donohue MF, Vlachos A, Davies SM, Kattamis A, Doherty L, Landowski M, Buros C, Ghazvinian R, Sieff CA, Newburger PE, Niewiadomska E, Matysiak M, Glader B, Atsidaftos E, Lipton JM, Gleizes PE, Beggs AH. Frameshift mutation in p53 regulator RPL26 is associated with multiple physical abnormalities and a specific pre-ribosomal RNA processing defect in diamond-blackfan anemia. *Hum Mutat*. 2012 Jul; 33(7) : 1037-44
292. Kamio T, Gu BW, Olson TS, Zhang Y, Mason PJ, Bessler M. Mice with a Mutation in the Mdm2 Gene That Interferes with MDM2/Ribosomal Protein Binding Develop a Defect in Erythropoiesis. *PLoS One*. 2016 Apr 4; 11(4) : e0152263
293. Yadav GV, Chakraborty A, Uechi T, Kenmochi N. Ribosomal protein deficiency causes Tp53-independent erythropoiesis failure in zebrafish. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014 Apr; 49 : 1-7
294. Singh SA, Goldberg TA, Henson AL, Husain-Krautter S, Nihrane A, Blanc L, Ellis SR, Lipton JM, Liu JM. p53-Independent cell cycle and erythroid differentiation defects in murine embryonic stem cells haploinsufficient for Diamond Blackfan anemia-proteins : RPS19 versus RPL5. *PLoS One*. 2014 Feb 18; 9(2) : e89098
295. Jia Q, Zhang Q, Zhang Z, Wang Y, Zhang W, Zhou Y, Wan Y, Cheng T, Zhu X, Fang X, Yuan W, Jia H. Transcriptome analysis of the zebrafish model of Diamond-Blackfan

- anemia from RPS19 deficiency via p53-dependent and -independent pathways. *PLoS One*. 2013 Aug 19; 8(8) : e71782
296. Torihara H, Uechi T, Chakraborty A, Shinya M, Sakai N, Kenmochi N. Erythropoiesis failure due to RPS19 deficiency is independent of an activated Tp53 response in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*. 2011 Mar; 152(5) : 648-54
297. Heijnen HF, van Wijk R, Pereboom TC, Goos YJ, Seinen CW, van Oirschot BA, van Dooren R, Gastou M, Giles RH, van Solinge W, Kuijpers TW, Gazda HT, Bierings MB, Da Costa L, MacInnes AW. Ribosomal protein mutations induce autophagy through S6 kinase inhibition of the insulin pathway. *PLoS Genet*. 2014 May 29; 10(5) : e1004371
298. Geoffrey M Cooper/ Jean-Marc François/ Camille François De boeck la cellule 1999
299. Lafontaine DL. Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function. *Nat Struct Mol Biol*. 2015 Jan; 22(1) : 11-9
300. Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Feb; 11(2) : 113-27
301. <http://biochimej.univangers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/2Biochimie/1SyntheseProteines/1SyntheseProt.htm>
302. Bommer U.A., Stahl J., Henske A., Lutsch G., Bielka H. Identification of proteins of the 40S ribosomal subunit involved in interaction with initiation factor eIF-2 in the quaternary initiation complex by means of monospecific antibodies. *FEBS Lett*. 1988; 233 : 114-118
303. Lutsch G, Stahl J, Kärger HJ, Noll F, Bielka H. Immunoelectron microscopic studies on the location of ribosomal proteins on the surface of the 40S ribosomal subunit from rat liver. *Eur J Cell Biol*. 1990 Feb; 51(1) : 140-50
304. Campagnoli MF, Ramenghi U, Armiraglio M, et al. RPS19 mutations in patients with Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat*. 2008; 29 : 911-920
305. Orru S, Aspesi A, Armiraglio M, et al. Analysis of the ribosomal protein S19 interactome. *Mol Cell Proteomics*. 2007; 6 : 382-393
306. Léger-Silvestre I, Caffrey JM, Dawaliby R, et al. Specific role for yeast homologs of the Diamond-Blackfan anemia-associated Rps19 protein in ribosome synthesis. *J Biol Chem* 2005; 280 : 38177-85
307. Flygare J, Aspesi A, Bailey JC, Miyake K, Caffrey JM, Karlsson S, Ellis SR. Human RPS19, the gene mutated in Diamond-Blackfan anemia, encodes a ribosomal protein required for the maturation of 40S ribosomal subunits. *Blood*. 2007 Feb 1; 109(3) : 980-6
308. Idol RA, Robledo S, Du HY, et al. Cells depleted for RPS19, a protein associated with Diamond Blackfan Anemia, show defects in 18S ribosomal RNA synthesis and small ribosomal subunit production. *Blood Cells Mol Dis*. 2007; 39 : 35-43
309. Flygare J, Kiefer T, Miyake K, et al. Deficiency of ribosomal protein S19 in CD34+ cells generated by siRNA blocks erythroid development and mimics defects seen in Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 2005; 105 : 4627-4634
310. Choessel V, Fribourg S, Aguisa-Toure AH, et al. Mutation of ribosomal protein RPS24 in Diamond-Blackfan anemia results in a ribosome biogenesis disorder. *Hum Mol Genet*. 2008; 17 : 1253-1263

311. Garçon L, Ge J, Manjunath SH, Mills JA, Apicella M, Parikh S, Sullivan LM, Podsakoff GM, Gadue P, French DL, Mason PJ, Bessler M, Weiss MJ. Ribosomal and hematopoietic defects in induced pluripotent stem cells derived from Diamond Blackfan anemia patients. *Blood*. 2013 Aug 8; 122(6) : 912-21
312. Zhang J, Harnpicharnchai P, Jakovljevic J, Tang L, Guo Y, Oeffinger M, Rout MP, Hiley SL, Hughes T, Woolford JL Jr. Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recruit 5S rRNA and ribosomal proteins rpL5 and rpL11 into nascent ribosomes. *Genes Dev*. 2007 Oct 15; 21(20) : 2580-92
313. Liao JM, Zhou X, Gatignol A, Lu H. Ribosomal proteins L5 and L11 co-operatively inactivate c-Myc via RNA-induced silencing complex. *Oncogene*. 2014 Oct 9; 33(41) : 4916-23
314. Nie Z, Hu G, Wei G, Cui K, Yamane A, Resch W, Wang R, Green DR, Tessarollo L, Casellas R, Zhao K, Levens D. c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell*. 2012 Sep 28; 151(1) : 68-79
315. Dang CV. Have you seen...? : Micro-managing and restraining pluripotent stem cells by MYC. *EMBO J*. 2009 Oct 21; 28(20) : 3065-6
316. van Riggelen J, Yetil A, Felsher DW. MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat Rev Cancer*. 2010 Apr; 10(4) : 301-9
317. Masuo Obinata, Yasufumi Ohmori, Shinji Takada, Wataru Shoji. function of c-myc on Erythroid Differentiation and Heme Synthesis. AlphaMed Press ISBN 1-880854 18-X
318. Jayapal SR, Lee KL, Ji P, Kaldis P, Lim B, Lodish HF. Down-regulation of Myc is essential for terminal erythroid maturation. *J Biol Chem*. 2010 Dec 17; 285(51) : 40252-65
319. Dai MS, Arnold H, Sun XX, Sears R, Lu H. Inhibition of c-Myc activity by ribosomal protein L11. *EMBO J* 2007; 26 : 3332-45
320. Sloan KE, Bohnsack MT, Watkins NJ. The 5S RNP couples p53 homeostasis to ribosome biogenesis and nucleolar stress. *Cell Rep*. 2013 Oct 17; 5(1) : 237-47
321. Chakraborty A., Uechi T., Kenmochi N. Guarding the ‘translation apparatus’ : defective ribosome biogenesis and the p53 signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. 2011; 2 : 507-522
322. Bursać S., Brdovčak M.C., Pfannkuchen M., Orsolić I., Golomb L., Zhu Y., Katz C., Daftuar L., Grabušić K., Vukelić I. Mutual protection of ribosomal proteins L5 and L11 from degradation is essential for p53 activation upon ribosomal biogenesis stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012; 109 : 20467-20472
323. Karbstein K. Quality control mechanisms during ribosome maturation. *Trends Cell Biol*. 2013 May; 23(5) : 242-50
324. Liu JM, Ellis SR. Ribosomes and marrow failure : coincidental association or molecular paradigm? *Blood*. 2006; 107 : 4583-4588
325. Narla A, Ebert BL. Ribosomopathies : human disorders of ribosome dysfunction. *Blood*. 2010; 115 : 3196-3205
326. Bolze A, Mahlaoui N, Byun M, Turner B, Trede N, Ellis SR, Abhyankar A, Itan Y, Patin E, Brebner S, Sackstein P, Puel A, Picard C, Abel L, Quintana-Murci L, Faust SN,

Williams AP, Baretto R, Duddridge M, Kini U, Pollard AJ, Gaud C, Frange P, Orbach D, Emile JF, Stephan JL, Sorensen R, Plebani A, Hammarstrom L, Conley ME, Selleri L, Casanova JL. Ribosomal protein SA haploinsufficiency in humans with isolated congenital asplenia. *Science*. 2013 May 24; 340(6135) : 976-8

327. De Keersmaecker K, Atak ZK, Li N, Vicente C, Patchett S, Girardi T, Gianfelici V, Geerdens E, Clappier E, Porcu M, Lahortiga I, Lucà R, Yan J, Hulselmans G, Vranckx H, Vandepoel R, Sweron B, Jacobs K, Mentens N, Wlodarska I, Cauwelier B, Cloos J, Soulier J, Uyttebroeck A, Bagni C, Hassan BA, Vandenberghe P, Johnson AW, Aerts S, Cools J. Exome sequencing identifies mutation in CNOT3 and ribosomal genes RPL5 and RPL10 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2013 Feb; 45(2) : 186-90

328. Wang H, Yu J, Zhang L, Xiong Y, Chen S, Xing H, Tian Z, Tang K, Wei H, Rao Q, Wang M, Wang J. RPS27a promotes proliferation, regulates cell cycle progression and inhibits apoptosis of leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Apr 18; 446(4) : 1204-10

329. Ebert BL PJ, Bosco J, Chang CY, Tamayo P, Galili N, Raza A, Root DE, Attar E, Ellis SR, Golub TR. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*. 2008; 451 : 335-339

330. Lefebvre T, Dessendier N, Houamel D, Ialy-Radio N, Kannengiesser C, Manceau H, Beaumont C, Nicolas G, Gouya L, Puy H, Karim Z. LC-MS/MS method for hepcidin-25 measurement in human and mouse serum : clinical and research implications in iron disorders. *Clin Chem Lab Med*. 2015 Sep 1; 53(10) : 1557-67

331. Calero-Garcia M, Gaspar HB. Gene-ectomy : gene ablation with CRISPR/Cas9 in human hematopoietic cells. *Cell Stem Cell*. 2014 Nov 6; 15(5) : 529-30

332. Kurita R, Suda N, Sudo K, Miharada K, Hiroyama T, Miyoshi H, Tani K, Nakamura Y. Establishment of immortalized human erythroid progenitor cell lines able to produce enucleated red blood cells. *PLoS One*. 2013; 8(3) : e59890

333. Zhang Z, Jia H, Zhang Q, Wan Y, Song B, Jia Q, Liu H, Zhu X, Fang X. Transcriptome analysis of Rpl11-deficient zebrafish model of Diamond-Blackfan Anemia. *Genom Data*. 2014 Jun 17; 2 : 173-5

334. Quigley JG, Gazda H, Yang Z, Ball S, Sieff CA, Abkowitz JL. Investigation of a putative role for FLVCR, a cytoplasmic heme exporter, in Diamond-Blackfan anemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2005; 35(2) : 189-192

335. Mercurio S, Petrillo S, Chiabrando D, Bassi ZI, Gays D, Camporeale A, Vacaru A, Miniscalco B, Valperga G, Silengo L, Altruda F, Baron MH, Santoro MM, Tolosano E. The heme exporter Flvcr1 regulates expansion and differentiation of committed erythroid progenitors by controlling intracellular heme accumulation. *Haematologica*. 2015 Jun; 100(6) : 720-9

336. Mercurio S, Aspesi A, Silengo L, Altruda F, Dianzani I, Chiabrando D. Alteration of heme metabolism in a cellular model of Diamond-Blackfan anemia. *Eur J Haematol*. 2016 Apr; 96(4) : 367-74

337. Yang Z, Keel SB, Shimamura A, Liu L, Gerds AT, Li HY, Wood BL, Scott BL, Abkowitz JL. Delayed globin synthesis leads to excess heme and the macrocytic anemia of Diamond Blackfan anemia and del(5q) myelodysplastic syndrome. *Sci Transl Med*. 2016 May 11; 8(338) : 338ra67

338. Wan Y, Zhang Q, Zhang Z, Song B, Wang X, Zhang Y, Jia Q, Cheng T, Zhu X, Leung AY, Yuan W, Jia H, Fang X. Transcriptome analysis reveals a ribosome constituents disorder involved in the RPL5 downregulated zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. *BMC Med Genomics*. 2016 Mar 9; 9 : 13
339. Porter JB, Walter PB, Neumayr LD, Evans P, Bansal S, Garbowski M, Weyhmiller MG, Harmatz PR, Wood JC, Miller JL, Byrnes C, Weiss G, Seifert M, Grosse R, Grabowski D, Schmidt A, Fischer R, Nielsen P, Niemeyer C, Vichinsky E. Mechanisms of plasma non-transferrin bound iron generation : insights from comparing transfused diamond blackfan anaemia with sickle cell and thalassaemia patients. *Br J Haematol*. 2014 Dec; 167(5) : 692-6
340. Roggero S, Quarello P, Vinciguerra T, Longo F, Piga A, Ramenghi U. Severe iron overload in Blackfan-Diamond anemia : a case-control study. *Am J Hematol*. 2009 Nov; 84(11) : 729-32
341. Dusan Holub, Zuzana Zidova, Barbora Ludikova, Lucie Sulovska, Vladimir Divoky, Monika Horvathova. Erythropoiesis and Iron Metabolism In Diamond-Blackfan Anemia. *Blood* 2013 122 : 2478
342. Han AP, Yu C, Lu L, Fujiwara Y, Browne C, Chin G, Fleming M, Leboulch P, Orkin SH, Chen JJ. Heme-regulated eIF2 α kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency. *EMBO J*. 2001 Dec 3; 20(23) : 6909-18
343. Suragani RN, Zachariah RS, Velazquez JG, Liu S, Sun CW, Townes TM, Chen JJ. Heme-regulated eIF2 α kinase activated Atf4 signaling pathway in oxidative stress and erythropoiesis. *Blood*. 2012 May 31; 119(22) : 5276-84
344. Boultonwood J, Pellagatti A. Reduced translation of GATA1 in Diamond-Blackfan anemia. *Nat Med*. 2014 Jul; 20(7) : 703-4
345. Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, Brugnara C, Lodish HF. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a $^{-/-}$ 5b $^{-/-}$ mice : a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell*. 1999 Jul 23; 98(2) : 181-91
346. Zhao W, Kitidis C, Fleming MD, Lodish HF, Ghaffari S. Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood*. 2006 Feb 1; 107(3) : 907-15
347. O'Donohue, M.F., Choismel, V., Faublader, M., Fichant, G. & Gleizes, P.E. Functional dichotomy of ribosomal proteins during the synthesis of mammalian 40S ribosomal subunits. *J Cell Biol*. 2010. 190, 853-866
348. Horn HF, Vousden KH. Cooperation between the ribosomal proteins L5 and L11 in the p53 pathway. *Oncogene*. 2008 Oct 2;27(44):5774-84
349. Harigae H, Nakajima O, Suwabe N, Yokoyama H, Furuyama K, Sasaki T, Kaku M, Yamamoto M, Sassa S. Aberrant iron accumulation and oxidized status of erythroid-specific delta-aminolevulinic synthase (ALAS2)-deficient definitive erythroblasts. *Blood*. 2003 Feb 1;101(3):1188-93
350. Wakabayashi A, Ulirsch JC, Ludwig LS, Fiorini C, Yasuda M, Choudhuri A, McDonel P, Zon LI, Sankaran VG. Insight into GATA1 transcriptional activity through interrogation of cis elements disrupted in human erythroid disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Apr 19;113(16):4434-9

351. Kumar S, Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett.* 2005 Jul 4;157(3):175-88.

ANNEXES

ANNEXE 1

Figure supplémentaire 1. Les cellules shRPL5, RPL11 et shRPS19 ont un retard de différenciation érythroïde. Expression des marqueurs CD34 et CD36 dans des cellules shRPL5, shRPL11, shRPS19, shcontrôle et non-infectées à J7.

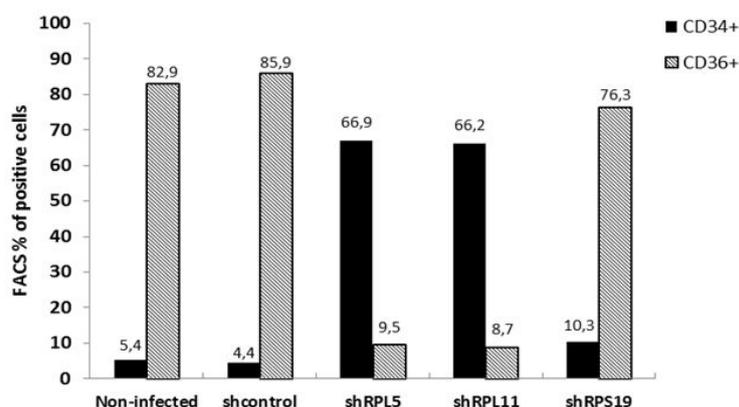


Figure supplémentaire 2. Les cellules shRPL5, RPL11 et shRPS19 ont un retard de prolifération *in vitro*. Prolifération cellulaire des cellules shRPL5, RPL11 et shRPS19 entre le quatrième (D4) et le quinzième jour de culture (D15).

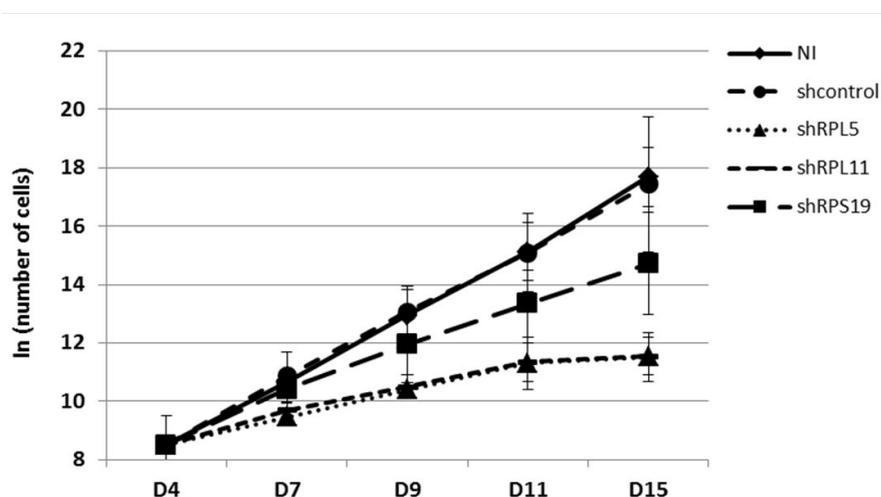


Tableau 4. Liste des patients de l'étude

DBA ID	Mutation	Sexe	age (years old)	Transfusion	Treatment	Malformations
DBA 591	RPS19	M	35	yes	Ferriprox + Exjade	no
DBA 892	RPS19	M	27	yes	Exjade	no
DBA 826	RPS19	M	41	no	Corticoids	no
DBA 35	RPS19	F	56	yes	Desféral	yes
DBA 1099	RPL11	M	22	yes	Exjade	yes
DBA 597	RPL11	M	50	no	Corticoids/Primperan	yes
DBA 905	RPS26	F	20	no	Corticoids	no
DBA 590	RPL5	F	21	yes		no
DBA 1102	unknown	F	37	yes	Ferriprox + Desféral	yes
DBA 390	unknown	M	15	no	Corticoids	yes
DBA 631	unknown	F	50	no	therapeutic independence	yes

ANNEXE 2

Article I

A role for HSP70 in Diamond-Blackfan anemia

Marc Gastou ^{*}, Sarah Rio ^{*}, Mickael Dussiot, Narjesse Karboul, Hélène Moniz, Thierry Leblanc, Margaux Sevin, J erome Largh ero, Carmen Garrido, Narla Mohandas, William Vainchenker, Eric Solary, Olivier Hermine, Lydie Da Costa

En soumission

A role for HSP70 in Diamond-Blackfan anemia

Marc Gastou^{1,2,3*}, Sarah Rio^{2,3,4*}, Mickael Dussiot^{3,5,6}, Narjesse Karboul^{2,3,4}, Hélène Moniz^{1,9}, Thierry Leblanc⁷, Margaux Sevin^{3,8}, J erome Largh ero^{2,10}, Carmen Garrido^{3,8}, Narla Mohandas¹¹, William Vainchenker^{1,3,9}, Eric Solary^{1,9}, Olivier Hermine^{3,5,6}, Lydie Da Costa^{2,3,4,12}

* contributed equally in the work

On behalf of the French Society of Hematology (SFH) and the French Society of Immunology and Hematology (SHIP).

1. Inserm U1170, Institut Gustave Roussy, F-94805, Villejuif

2. Université Paris 7 Denis Diderot-Sorbonne Paris Cité, F-75010, Paris

3. LABEX GR-Ex

4. Inserm U1149, CRI, Faculté de Médecine Xavier Bichat, F-75019, Paris

5. UMR 1163, Institut Imagine, F-75015, Paris

6. Université Paris Descartes, F-75015, Paris

7. AP-HP, hôpital Robert Debré, service d'onco-hématologie pédiatrique, F-75019, Paris

8. Inserm U866, Université de Bourgogne, F-21000 Dijon,

9. Université Paris 11, F-91405 Orsay

10. AP-HP, Service de Thérapie cellulaire, Banque de sang de cordons, Hôpital Saint-Louis, Paris, F-75010

11. Red cell physiology Laboratory, New York Blood Center, NYBC, NY, USA

12. AP-HP, hôpital Robert Debré, service d'h ematologie biologique, F-75019, Paris

Key words: erythroblastopenia, Diamond-Blackfan anemia, DBA, ribosome, GATA1, HSP70, proteasome.

Abstract:

Diamond-Blackfan anemia, a rare congenital bone marrow failure exhibits an erythroid tropism, which is been so far not completely fully understood. DBA is related to a mutation in 70% of the DBA cases in a ribosomal protein gene. We and other groups have shown that p53 stabilization is responsible at least in part for DBA erythroblastopenia by increased apoptosis and cell cycle arrest in G₀/G1. We identified previously two different DBA *in vitro* phenotypes, the RPS19^{+Mut} and RPL11^{+Mut} phenotypes. Since the degree of apoptosis and the delay in erythroid differentiation were the major differences between these two phenotypes, we explored this pathway. We showed in primary erythroid cells from DBA patients, that HSP70, which protects the major erythroid transcription factor, GATA1 from the caspase 3 cleavage during terminal erythroid differentiation, exhibited a dramatic decreased expression level. HSP70 has been found degraded by the proteasome. HSP70 overexpression decreased p53 activation, suggesting that HSP70 acts as a negative control of p53 stabilization. Indeed, the erythroid intrinsic defect in DBA affected patients has been recovered after overexpression of wild-type HSP70. Our results points out that HSP70 the chaperone of GATA1 is one of the major key factors of the erythroid tropism in DBA. (200 mots, max 200 pour une lettre)

Introduction

Eukaryotic ribosome is a spatially and temporally well-coordinated structure made of two ribosomal subunits, 80 ribosomal proteins (RP), 4 ribosomal RNAs (rRNAs), and more than 200 cofactors ¹. A defect in ribosome biogenesis was involved in a variety of hematopoietic diseases, including malignancies such as acute T lymphoblastic leukemia (RPL10, RPL5)², acute and chronic myeloid leukemia (RPS27a) ³ and myelodysplastic syndrome with 5q- (RPS14)⁴, and congenital disorders such as congenital asplenia (RPSA)⁵ and bone marrow failure syndromes including Shwachman-Diamond syndrome, congenital dyskeratosis, and Diamond-Blackfan anemia (DBA).

A constitutive heterozygous mutation in one out of 14 RP genes is identified in 70% of DBA, which was the first described ribosomopathy ⁶ (OMIM 105650). These genes include *RPS19* (25%), *RPS7* (<1%), *RPS17* (1%), *RPS24* (2.4%), *RPS10* (3%), *RPS26* (7%), *RPS27a* (<1%), *RPS28*, *RPS29*, *RPL5* (7%), *RPL11* (5%), *RPL15* (<1%), *RPL26*, *RPL35a* (3%). The disease is characterized by an erythroblastopenia with no or less than 5% of erythroid precursors in an otherwise normocellular and non-dysplastic bone marrow, which is responsible for an aregenerative, usually macrocytic anemia. This erythroblastopenia is the unique clinical feature of 60% of DBA cases while being associated to diverse congenital abnormalities, mostly in the cephalic area and the extremities, in the others ⁷. In DBA affected patients who do not carry a mutation in one of the RP genes, no mutation was identified in genes encoding erythropoietin receptor (*EPOR*) ⁸, stem cell factor receptor (*KIT*) ^{9 10}, and interleukin-9 (*IL-9*) ¹¹, but mutations were detected in the key transcription factor GATA1 that induced a loss of its transactivation domain in few DBA patients ¹²⁻¹⁵.

The reason why haploinsufficiency in some RP genes affects erythropoiesis remains poorly understood. Identification of a translational defect of GATA1 mRNA suggested that abnormal expression of this transcription factor may account for the erythroid tropism of DBA ¹⁵. Abnormal GATA-1 expression could be also the consequence of the down-regulation of a key chaperone of GATA1, the Heat Shock Protein HSP70 ¹⁶. This ATP-dependent stress protein is expressed in the cytoplasm of basophil erythroblasts. Upon EPO stimulation, erythroblast differentiation requires caspase-3 activation and HSP70 migrates from the cytoplasm to the nucleus to protect GATA1 from caspase-3 mediated cleavage, which would inhibit the differentiation process and induce erythroblast apoptosis ¹⁷. A defective relocalisation of HSP70 to the nucleus of EPO-stimulated erythroblasts was involved in the pathogenesis of anemia in some myelodysplastic syndromes (MDS) ¹⁸ and in β -thalassemia ¹⁹.

We and other groups have previously identified two distinct DBA phenotypes in RP-deficient patients²⁰. *RPS19* haploinsufficiency decreases erythroid proliferation without affecting erythroid differentiation nor inducing premature apoptosis, whereas *RPL5* or *RPL11* haploinsufficiencies dramatically affect erythroid cell proliferation, delay erythroid differentiation, and induce erythroid cell apoptosis²⁰. Here, we show that the differential regulation of HSP70 expression in erythroblasts could be responsible for these distinct phenotypes: an abnormal degradation of HSP70 was detected in haploinsufficient *RPL5* or *RPL11* human primary cells, but not in *RPS19* haploinsufficient erythroid cells.

Results

We analyzed the expression of HSP70 in primitive erythroid cells obtained by *ex vivo* differentiation of CD34⁺ cells collected from controls and *RPL5*^{+/^{Mut}}, *RPL11*^{+/^{Mut}} or *RPS19*^{+/^{Mut}} affected DBA patients. At day 10 of the culture, we observed that HSP70 protein expression was dramatically decreased in *RPL5*^{+/^{Mut}} and *RPL11*^{+/^{Mut}} as compared to wildtype and *RPS19*^{+/^{Mut}} samples (**Fig. 1A**). The decrease in HSP70 expression was associated with a decrease in procaspase-3 expression (**Fig. 1A**). These events could be reproduced by using short hairpin RNAs (shRNAs)²⁰ to specifically decrease *RPL5*, *RPL11* and *RPS19* in cord blood CD34⁺ cells before inducing their erythroid differentiation (**Fig. 1B**). In accordance with our previous observations, the down-regulation of the three studied RP genes was associated with an increased phosphorylation of p53 (not shown) whereas only the down-regulation of *RPL5* and *RPL11* increased apoptosis, as shown by a decreased procaspase-3 expression, suggesting its cleavage. The down-regulation of HSP70 in human *RPL5* and *RPL11* haploinsufficient erythroid cells was further confirmed both in DBA patients and in the shRNA model by using the AMNIS Image Stream Imaging flow cytometry technology, which combines flow cytometry with detailed imagery of microscopy. Again, HSP70 expression remained similar to that observed in control samples, in *RPS19* haploinsufficient erythroid cells, while HSP70 expression level was significantly decreased in haploinsufficient *RPL5* or *RPL11* erythroid cells (**Fig. 1C and Fig. suppl 1A**).

Since HSP70 subcellular mislocalization has been observed in MDS¹⁸ and β -thalassemia erythroid cells, we analyzed HSP70 location at day 10 of erythroid cell differentiation by combining confocal microscopy and AMNIS technology (**Fig. 1D**). In 4 independent experiments, in the *RPL5* and *RPL11* haploinsufficient erythroid cells, we observed a uniform decrease in HSP70 expression in both the cytoplasm and the nucleus, without abnormal repartition between these two cell compartments (**Fig. 1D top and bottom panels**).

We made the same observation in two DBA families, one with a DBA affected proband carrying a *RPS19* gene mutation and his non affected parents, and the other in a mother and his son, both affected with DBA and carrying the same *RPL11* gene mutation (**Fig. suppl 1A**).

The decrease in HSP70 was not identified in lymphoblastoid cell lines established from *RPL5*^{+/*Mut*} and from *RPL11*^{+/*Mut*} DBA patients, suggesting the erythroid specificity of its down-regulation and reinforcing the role of HSP70 in the erythroid tropism of the disease (**Fig. suppl 2A**). Furthermore, we did not detect any change in the basal expression of two other heat shock proteins, namely HSP90 and HSP27, in erythroid cells derived from shRNA-RPL5 (not shown), -RPL11 and -RPS19 lentiviral infected CD34⁺ cells, indicating a specific alteration of HSP70 in RPL5 and RPL11 haploinsufficient erythroid cells (**Fig. suppl 2B**).

Using a human primitive erythroid cell culture synchronization method²¹ and cell sorting (**Fig. suppl 3**), we noticed in healthy donors an increase in HSP70 expression, together with a previously reported increase in GATA1 expression (not shown)²² between BFU-e and CFU-e differentiation stages (**Fig. 1E**). This differentiation-associated increase in HSP70 and GATA1 expression was conserved after shRNA-mediated down-regulation of RPS19 (**Fig. 1E**) whereas the expression of HSP70 was decreased and remained unchanged from BFU-e to CFU-e generated from shRPL5- or shRPL11-transduced cord blood CD34⁺ cells (**Fig. 1E**). The defect in HSP70 is clearly evident at the CFU-e stage after RPL5 and RPL11 erythroid cell invalidation.

Transduction of HSP70 cDNA in RPL11 haploinsufficient CD34⁺ cells partially rescued erythroid cells from day 7 (proerythroblasts) to day 11 (orthophilic erythroblasts) of erythroid cell culture, whereas HSP70 overexpression did not affect erythroid differentiation of RPS19 haploinsufficient cells (**Fig. 2A**). We subsequently synchronized erythroid cell cultures²¹ before sorting BFU-e and CFU-e progenitors to further induce their erythroid differentiation. We confirmed the major defect in erythroid cell proliferation of RPL11 compared to RPS19 deficient cells and control cells (**Fig. 2B**). Overexpression of HSP70 cDNA in RPL11 deficient CD34⁺ cells increased the proliferation of BFU-e- and CFU-e-derived erythroid cells, which was not observed when overexpressing HSP70 in RPS19 haploinsufficient cells (**Fig. 2B**).

Using Amnis technology, we observed that transduced HSP70 increased the expression of the HSP70 protein in the human erythroid progenitors at day 7 and in both the nucleus and the cytoplasm of erythroid cells, whatever their genetic background and that HSP70 expression level was restored in RPL11 haploinsufficient erythroid cells to that observed in control cells

(**Fig. 2C, top panel and 2E AMNIS images**). Importantly, overexpression of HSP70 in RPL11 haploinsufficient erythroid cells was associated with a significant increase in GATA1 expression into the cell nucleus (**Fig. 2D, bottom left panel and 2E bottom AMNIS images**). Strikingly, in both RPS19 and RPL11-haploinsufficient cells, over-expression of GATA1 chaperone, HSP70 increased significantly the expression level of the globin protein, the principal target genes of GATA1, suggesting that HSP70 could improve the erythroid *in vitro* phenotype defect (**Fig. 2D, bottom and right panel**). The increase expression level in the globin chains is not as high as expected since the quantification has been done at day 7, when the globin chain expression begins.

Transduction of peripheral blood CD34⁺ cells from DBA patients (one RPS19^{+Mut} and 4 RPS11^{+Mut} from 3 distinct families) with a lentivirus encoding wild type *HSP70* gene increased erythroid cell proliferation (**Fig. 3A**). Of note, a mother and her son carrying the same *RPL11* gene mutation exhibited the same erythroid proliferation curves at the steady state and the same response to HSP70 overexpression (**Fig. 3A, bottom left-2N**). In RPS19^{+Mut} (data not shown) and in RPL11^{+Mut} transduced cells, at day 9 of synchronized erythroid cell culture, HSP70 expression level increased to the level observed in the controls (**Fig. 3B**). In RPL11^{+Mut} erythroid cells, HSP70 overexpression restored GATA1 and globin chain expression (**Fig. 3B**), increasing alpha more than beta globin chains (**Fig. suppl 1B Amnis images from the RPL11^{+Mut} patients, son and his mother, both affected with DBA**). As previously found after erythroid cell depletion by the shRNA-RPL11 and HSP70 overexpression (data not shown), the increased expression level was more pronounced in the alpha-globin chains, probably be due to the fact that the alpha globin genes are replicated in 2 tandem copies on each 16 chromosomes, while there are only 2 copies of beta-globin chain genes in the genome. HSP70 overexpression also decreased the level of apoptosis as stated on the increased procaspase-3 expression level, confirming that its cleavage has been abolished in RPL11^{+Mut} DBA patient (**Fig. 3B**). The lower degree of apoptosis induction has been found as well on the decrease in the percentage of the DAPI⁻/annexin V⁺ erythroid cells in the RPL11^{+Mut} DBA patient to a level even lower to the control cells (**Fig. 3C right dot plots**). We then analyzed the erythroid differentiation in wild type HSP70 overexpressed erythroid cells derived from peripheral blood CD34⁺ cells from various DBA patients carrying mutation in *RPS19* or *RPL11* genes. RPL11^{+Mut} DBA affected patients exhibited as previously found the delayed in erythroid differentiation that we observed in the RPL11 deficient *in vitro* phenotype²⁰. Strikingly, we were able to restore the erythroid differentiation in all the RPL11^{+Mut} patients studied as shown on the decreased number of erythroid cells expressing the IL3-R from 26.4% of cells to 8.3% after HSP70 transduction,

the increased number of CD34⁺/CD36⁺ erythroid cells from 23.7% to 92.6% and finally the increased number of cells exhibiting both Band3 and alpha-integrin labelling on their surface from 22.9% at the steady state in the RPL11 deficient erythroid cells to 83% in overexpressed erythroid cells from the same RPL11^{+Mut} DBA patient (**Fig. 3C left panels**). Thus, HSP70 over-expression was able to correct, in RPL11^{+Mut} DBA affected patients, the erythroid proliferation defect, the erythroid differentiation delay, the increased apoptosis, and the down-regulation of the globin chain expression in the erythroid cells, which are all the major features of DBA disease. These results confirm thus strongly the major role of HSP70 in the erythroid defect in DBA and suggest that HSP70 may be one of the major targets for new therapeutic developments in DBA.

We subsequently explored the mechanism leading to HSP70 decreased expression in RPL5 and RPL11 haploinsufficient erythroid cells. We did not detect any significant change in HSP70 and GATA1 mRNA expression in erythroid cells with a RP gene haploinsufficiency, as compared to those of healthy donors using two reporter genes (**Fig. 4A**). Furthermore, using radioactive metabolic S35 staining, we did not detect any major defect in HSP70 protein synthesis in RPL5 and RPL11 haploinsufficient EPO-dependent UT-7 cells compared to wild-type and RPS19 haploinsufficient cells (**Fig. 4B**). Since HSP70 post-translational modifications have been described, we analyzed the different protein modifications leading to proteolysis and proteasomal degradation. Mostly, a protein addressed for proteasome degradation is first tagged by polyubiquitin chain following an enzymatic cascade. Polyubiquitinated protein is recognized by the 19S proteasome component as a substrate for proteolysis. Then, ubiquitin tagged proteins are unfolded into the 20S core of the proteasome and ultimately cleaved into small oligopeptides from 3 to 23 amino acids while ubiquitin molecules are released and recycled²³. First we analyzed the predicted sites of the HSP70 protein sequence for ubiquitinylation and found several sites (**Table 1**). To reinforce our hypothesis that HSP70 is possibly ubiquitinated in DBA, we performed different immunoprecipitation experiments in EPO-dependent UT7 RPS19, RPL5 and RPL11 deficient cell lines in order to collect enough cells compared to primitive human DBA affected erythroid cells, which were used in all the experiments in this study (**Fig. suppl 4**). Immunoprecipitated first all the mono or polyubiquitinated proteins and revealed them by a specific antibody against HSP70, we observed a labeled band only after inhibition of RPL11 and RPS19 and surprisingly at an upper molecular weight compared to HSP70 usual molecular weight of 70kDa, suggesting that HSP70 in these cases may be polyubiquitinated. Strikingly, the band intensity was stronger in the cells depleted in RPL11 compared to RPS19, suggesting a more important ubiquitinylation of HSP70 in RPL11

depleted cells. All the negative and positive controls were accurate and as expected. In order to validate our findings, we performed the reverse experiments, immunoprecipitating HSP70 and revealed whether HSP70 was ubiquitinated or not (**Fig. suppl 4, right panel**). We confirmed that HSP70 was importantly ubiquitinated in RPL11 depleted EPO-UT7 cell lines compared to the controls and RPS19 depleted cell lines. The MG132 treatment, a reversible proteasome inhibitor, increased largely the polyubiquitination of HSP70 in RPL11 depleted EPO-UT7 cell lines, confirming that the HSP70 has been polyubiquitinated prior to be addressed for proteasomal degradation.

Conversely, proteasome inhibition with either MG132 or lactacystin, which is the most specific and irreversible inhibitor of the proteasome, restored the expression of HSP70 to normal level in RPL5 or RPL11 deficient erythroid cells (**Fig. 4C**). Of note proteasomal inhibition also increased the expression of HSP70 in non-infected and SCR infected erythroid cells, suggesting that the proteasomal pathway is involved in HSP70 regulation during normal erythroid differentiation (**Fig. 4C left and right panels**). These results were specific of HSP70 since the expression of both HSP27 and HSP90 was not affected by proteasomal inhibition (data not shown). Using confocal microscopy and Amnis technology, we observed that proteasome inhibition with either MG132 (**Fig. 4C, right panel**) or lactacystin (**Fig. 4C, bottom panel**) restored HSP70 protein expression level in both subcellular compartments, the cytoplasm and the nucleus and its colocalization with GATA1 in shRPL11 haploinsufficient erythroid cells. Furthermore, proteasomal inhibition by the lactacystin restored in addition to HSP70, partially GATA1 expression in RPL11 haploinsufficient erythroid cells and the ZVAD, a potent caspase inhibitor was able to restore HSP70 (data not shown). Measurement of proteasomal activity in CD34⁺ cells undergoing erythroid differentiation did not detect any increase in proteasome activity in RP gene haploinsufficient cells compared to wild type cells suggesting that the observed effect on HSP70 proteasomal degradation is not due to an overall protein degradation process (**Fig. Suppl 5**). To date, our study is the first study showing the proteasomal degradation of HSP70 either in the normal erythroid cells during terminal erythroid differentiation and in RPS19 and RPL11 deficient cells.

In order to definitely validate the role of the proteasome in HSP70 defect in RPL11 phenotype *in vitro*, we analyzed the effect of the lactacystin on the HSP70 (**Fig. 4D top panel**) and alpha/beta globin chain expression in various DBA affected patients and unaffected relatives (**Fig. 4D bottom panel**). The lactacystin could increase the expression level of HSP70 in the erythroid cells derived from CD34⁺ DBA patient peripheral blood at day 7, close to the level of the healthy controls and as previously found in the *ex vivo* DBA

model (**Fig. 4E, top panel**). Strikingly, the lactacystin was able to restore at least in part as well both hemoglobin alpha and beta globin chain expression (**Fig. 4E, bottom panel**), confirming the major role of the proteasomal degradation in HSP70 defect in RPL11 phenotype *in vitro*. Proteasome inhibitors may also be a putative option in therapeutic treatment of DBA, with meanwhile the risk of an increased apoptosis in a disease known to be associated with an apoptosis induction. Targeting HSP70 may be at a lower risk for the patient and more targeted to the specific erythroid defect in DBA, compared to proteasome inhibitors.

We then explored the dependance of HSP70 degradation to p53 and the effect of HSP70 overexpression on p53 stabilization in DBA erythroid cells. After a ribosomal or nucleolar stress, it has been established a direct binding of some RP genes including RPL5, RPL11, RPS7, RPS23, RPS27 et RPS27-like, RPS3, RPS14, RPS20, RPS25, RPL26 to MDM2, which blocked the E3 ubiquitin ligase function of MDM2 and promoted p53 stabilization and activation (Horn, Vousden et al. 2008) (Holmberg Olausson, Nister et al. 2012). It has been recently shown that in non erythroid cells, under actinomycin-D nucleolar stress, RPL11 is transiently recruited at promoter sites of CBP/p300 transcriptional co-activators for p53 and p53-regulated genes, including p21 (Mahata, Sundqvist et al. 2012). However, in DBA, *RPL11* gene is mutated in 7% of DBA affected patients and could not resume by itself the p53 activation in the disease. We have shown indeed that in DBA *RPS19*^{+Mut} and *RPL11*^{+Mut} affected patients and in *RPS19* or *RPL11* depleted erythroid cells, p53 activation was responsible at least in part for the DBA characteristic erythroblastopenia by inducing apoptosis and cell cycle arrest in G0/G1 phasis²⁰. In this model, invalidation of p53 by a specific p53 shRNA reduced the transcription of p53 target, namely p21 and BAX, and increased the depleted *RPS19* erythroid cell proliferation back to normal, while the effect was milder in *RPL11* depleted erythroid cells, which may be due to the large increased apoptosis in this *in vitro* phenotype and the dramatic defect in erythroid proliferation. Inhibiting p53 activation may not able to restore completely the erythroid defect due the lack of cells. Meanwhile, p53-independent pathways have been also reported²⁴⁻²⁶. It has been recently found that p53 activation pathway in minus 5q, myelodysplastic syndrome was related to an activation of the TNF- α pathway, through proteins involved in the innate immune system, S100A8 and S100A9 (Schneider, Schenone et al. 2016). In our model, due to defect of HSP70 and secondary GATA1, we may hypothesized that p53 activation may be also related to GATA1 decreased expression as already shown by Trainor²⁷. GATA1 defect may thus be responsible for p53 activation, in addition to the RP-MDM2-p53 activation pathway after

overexpression of various RP. In addition, other p53 related proteins such as p63 and p73 may be involved.

However, we wonder if the proteasomal degradation and defect of HSP70 was dependent on p53 stabilization. Activation of p53 with nutlin 3a, an activator of p53 induced a dose and time-dependent increase in HSP70 expression in erythroid cells whereas inhibition of p53 with nutlin 3b did not affect HSP70 level. Strikingly, while as first stated in Fig. 4C, the MG132 proteasome inhibitor was able to increase HSP70 expression level and this increase was constant independently on the time of nutlin 3a cell exposure (**Fig. 5A, left panel**), or the nutlin 3a concentration (**Fig. 5A, right panel**), either in the total protein extract from erythroid precursors or the protein extract obtained after cell fragmentation and cytoplasm isolation (**Fig. 5A right panel**). Immunoprecipitated HSP70 and revealed with p53 antibody did not exhibit any binding of HSP70 to p53 in normal or erythroid EPO-dependent UT7 cell lines depleted in RPL11 before and after MG132 treatment (**Fig. 5B**). However, the level expression of p53 in UT7 cell lines has been found weak and p53 functionality in this cell line may be questionable. HSP70 decreased expression level in haploinsufficient RPL11 or RPL5 cells seems thus independent to the level of the p53 activation. Meanwhile in derived CD34⁺, p53 and phosphorylated p53 have been found decreased after wild type expression HSP70 overexpression in haploinsufficient shRNA-RPL5 or RPL11 erythroid cells at day 9 of terminal differentiation suggesting meanwhile a beneficial effect of HSP70 restoration in DBA erythroid defect (**Fig. 5C**). We may hypothesize that HSP70 with GATA1 protected by its chaperone, is able to inhibit the p53 pathway after p53 activation, leading to apoptosis inhibition in the case of RPS19 haploinsufficiency, while unable to do so in case of RPL11 haploinsufficiency due to HSP70 proteasomal degradation (**Fig. 6**). Further studies will be needed to completely decipher the p53 activation in DBA.

In conclusion, our findings confirmed the major and specific role of HSP70 in the mechanistic understandings of the DBA pathophysiology in the mutants, who exhibit the more severe phenotype *in vitro* (RPL5 or RPL11 deficient erythroid cells), and the occurrence of the specific erythroid defect in these patients. HSP70 as the chaperon protein of GATA1, protects usually GATA1 from the caspase 3 cleavage during terminal erythroid differentiation upon EPO stimulation. In DBA, HSP70 is addressed to the proteasome for degradation, leading to the defect of HSP70. GATA1 is in consequence not protected anymore and active caspase 3 cleaved GATA1, which is responsible for the defect of the terminal erythroid differentiation, the increased apoptosis in these particular mutants. The RPS19 phenotype seems not be related to HSP70 defect since the HSP70 expression level has been found normal in DBA mutated patients and in haploinsufficient RPS19 shRNA

erythroid cells derived from CD34⁺ cord blood, meanwhile overexpression of HSP70 is however able to restore RPS19 haploinsufficient erythroid proliferation, GATA1 and hemoglobin concentration in this phenotype. We can argue that the difference laid on the ability of BFU-e to proliferate and differentiate quite normally, compare to the RPL11 haploinsufficient BFU-e. The erythroid cells derived from BFU-e in case of RPS19 defect are lower but their ability to differentiate seems to be close to normal. By contrast, RPL11 haploinsufficient cells exhibited a larger decreased in erythroid cells not only derived from the CFU-e but also the BFU-e. A target in a pathway in derived BFU-e cells, yet to be defined should protect HSP70 from proteasomal degradation in the haploinsufficient RPS19 cells and the level of HSP70 may be enough in that case to protect correctly GATA1. By contrast, this target should be missing in case of RPL11 haploinsufficient erythroid cells derived from low number of BFU-e leading to HSP70 proteasomal degradation, GATA1 cleavage by the active caspase 3. However, these are speculation and further studies will need and focus in deciphering the discrepancies between RPS19 phenotypes and RPL11 related to the level of HSP70.

Furthermore, our findings of the major role of HSP70 in the occurrence of DBA and in the erythroid tropism of the disease will open further new therapeutic developments for DBA. An inovative treatment, which will increase HSP70 expression, will increase the erythroid proliferation, the hemoglobin concentration in DBA patients and cure them, avoiding the iterative transfusion program with its iron overload risk and the long term low dose steroid therapy side effects. No doubt that new therapeutics developpment targeting HSP70 will improve the DBA treatment options, the most important expectation of the physcists who take care of DBA patients and the DBA patients.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online method version of the manuscript. *Note: any supplementary information and source data files are available in the online version of the manuscript.*

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the patients affected with Diamond-Blackfan anemia and their families, the French DBA patients association “AFMBD”, the Maria Daniella Arturi and the DBA foundations. We honor Pr Gil Tchernia for his inspiration, scientific discussions and perpetual interest in DBA.

This work was supported by the French National Research Agency (ANR) with ANR-RIBOCRASH, the ANR HSPathies, the laboratory of excellence for Red cells (LABEX GR-Ex)- ANR Avenir (MG founding for his PhD), The PHRC OFABD (DBA registry and molecular biology), the “Fondation pour la Recherche médicale” (FRM) (HM founding for her PhD), The Fondation ARC pour la recherche contre le cancer (M.G and HM founding for their PhD).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.D.C, E.S, W.V and O.H conceived the project; M.G, S.R, N.K, H.M performed the research. M.D performed the Amnis experiments with M.G. M.S and M.G performed the IP experiments. T.L provided the clinical data and patients samples. N.M provided scientific input and N.M mentored NK for the erythroid cell culture synchronization experiments. M.G, S.R, N.K, H.M, M.D, M.S, L.D.C, E.S, W.V and O.H analyzed the data. L.D.C, O.H, E.S, W.V wrote the manuscript with input from all authors.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS:

No competing financial interests to declare

REFERENCIAS:

1. O'Donohue, M.F., Choismel, V., Faublader, M., Fichant, G. & Gleizes, P.E. Functional dichotomy of ribosomal proteins during the synthesis of mammalian 40S ribosomal subunits. *J Cell Biol* **190**, 853-866 (2010).
2. De Keersmaecker, K., *et al.* Exome sequencing identifies mutation in CNOT3 and ribosomal genes RPL5 and RPL10 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **45**, 186-190 (2014).
3. Wang, H., *et al.* RPS27a promotes proliferation, regulates cell cycle progression and inhibits apoptosis of leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* **446**, 1204-1210 (2014).
4. Ebert, B.L., *et al.* Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* **451**, 335-339 (2008).
5. Bolze, A., *et al.* Ribosomal protein SA haploinsufficiency in humans with isolated congenital asplenia. *Science* **340**, 976-978 (2013).
6. Leger-Silvestre, I., *et al.* Specific role for yeast homologs of the Diamond Blackfan anemia-associated Rps19 protein in ribosome synthesis. *J Bio Chem* **280**, 38177-38185 (2005).
7. Willig, T.N., *et al.* Diamond Blackfan anemia: clinical and epidemiological studies with identification of new long-term prognosis factors from the analysis of a registry of 234 patients. *Pediatr Res* **46**, 553-561 (1999).
8. Dianzani, I., *et al.* Mutations in the erythropoietin receptor gene are not a common cause of Diamond-Blackfan anemia. *Blood* **87**, 2568-2572 (1996).
9. Spritz, R. & Freedman, M. Lack of mutations of the MGF and KIT genes in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* **81**, 3165 (1993).
10. Drachtman, R., Geissler, E. & Alter, B. The SCF and c-kit genes in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* **79**, 2177-2178 (1992).
11. Schmahl, G., Rath, A. & Niemeyer, C. Genetic analysis of the transcription factor GATA-1 in Diamond-Blackfan Anemia. *Blood* **88**, 143a (1996).
12. Sankaran, V.G., *et al.* Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. *J Clin Invest* **122**, 2439-2443 (2012).
13. Parrella, S., *et al.* Loss of GATA-1 full length as a cause of Diamond-Blackfan anemia phenotype. *Pediatr Blood Cancer* **61**, 1319-1321 (2014).
14. Klar, J., Khalfallah, A., Arzoo, P.S., Gazda, H.T. & Dahl, N. Recurrent GATA1 mutations in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol* **166**, 949-951 (2014).
15. Ludwig, L.S., *et al.* Altered translation of GATA1 in Diamond-Blackfan anemia. *Nat Med* **20**, 748-753 (2014).
16. Zermati, Y., *et al.* Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* **193**, 247-254 (2001).
17. Ribeil, J.A., *et al.* Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* **445**, 102-105 (2007).
18. 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).
19. Arlet, J.B., *et al.* HSP70 sequestration by free alpha-globin promotes ineffective erythropoiesis in beta-thalassaemia. *Nature* **514**, 242-246 (2014).
20. Moniz, H., *et al.* Primary hematopoietic cells from DBA patients with mutations in RPL11 and RPS19 genes exhibit distinct erythroid phenotype in vitro. *Cell Death Dis* **3**, e356 (2012).
21. Hu, J., *et al.* Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. *Blood* **121**, 3246-3253 (2013).

22. Suzuki, M., Shimizu, R. & Yamamoto, M. Transcriptional regulation by GATA1 and GATA2 during erythropoiesis. *Int J Hematol* **93**, 150-155 (2011).
23. Glickman, M.H. & Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**, 373-428 (2001).
24. Horos, R., *et al.* Ribosomal deficiencies in Diamond-Blackfan anemia impair translation of transcripts essential for differentiation of murine and human erythroblasts. *Blood* **119**, 262-272 (2012).
25. Singh, S.A., *et al.* p53-Independent cell cycle and erythroid differentiation defects in murine embryonic stem cells haploinsufficient for Diamond Blackfan anemia-proteins: RPS19 versus RPL5. *PLoS One* **9**, e89098 (2014).
26. Antunes, A.T., *et al.* Ribosomal Protein Mutations Result in Constitutive p53 Protein Degradation through Impairment of the AKT Pathway. *PLoS Genet* **11**, e1005326 (2015).
27. Trainor, C.D., Mas, C., Archambault, P., Di Lello, P. & Omichinski, J.G. GATA-1 associates with and inhibits p53. *Blood* **114**, 165-173 (2009).
28. Vlachos, A., *et al.* Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference. *British journal of haematology* **142**, 859-876 (2008).

ONLINE METHODS

Population. A total of 13 patients affected with DBA and 13 hematologically normal individuals were studied. The DBA patients are registered in the French DBA registry. DBA was diagnosed according to established criteria²⁸. All cases were reviewed in detail at the time of analysis and **supplemental Table 2** shows the biological and clinical data of the DBA patients, which have been obtained from the institutions and physicians responsible for the patient's management. Human umbilical cord blood was collected from normal full-term deliveries after maternal informed consent according to approved institutional guidelines (AP-HP, Paris, France).

Study approval. All patients and their families provided written informed consent to participate in this study. Informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki.

Cell culture.

Cell lines. The UT-7-EPO human factor dependent erythroleukemic cell line (gifted by Komatsu lab, Japan) were maintained at a density 0.3×10^6 per milliliter in MEM α with 10 % Fetal Bovine Serum (FBS), 2 mM L-Glutamine and 1% penicillin-streptomycin (P/S) and 3 IU/ml EPO. EBNA 293T cells (HEK-293 stably expressed EBV EBNA-1 gene cell line, ATCC, Manassas, USA) were maintained in DMEM with 10 % FBS, 2 mM L-Glutamine and 1% penicillin-streptomycin. All cell cultures were maintained at 37°C with 5% CO₂.

Culture of human primary cells. CD34⁺ cells from peripheral blood of DBA patients or controls or from human cord blood were isolated by immunomagnetic technique using manual column for patient or control cells or autoMACS Pro Separator, for the cord blood samples (Miltenyi Biotec, Paris, France). Purified CD34⁺ cells from DBA patients and controls were cultured in IMDM medium ((Life technologies Carlsbad, CA, USA)) containing 1% L-Glutamine (Life technologies), 1% P/S (Life technologies), α -monothioglycerol (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), 1.5% bovine serum albumin

(Stemcell Technologies, Sheffield, United Kingdom), and 2% liposome, iron-saturated transferrin (Sigma-Aldrich), 50 ng/ml stem cell factor (SCF) (Biovitrum AB, Stockholm, Sweden), 1 IU/ml interleukin-3 (IL-3) (Miltenyi, Paris, France), 1 IU/ml EPO and 10% FBS. At day 7, cultures were switched to the same medium but with 30% FBS (from D7 to Day D12). For cell synchronization and patients cell culture, we used another media from Mohandas Narla Laboratory using 3% AB serum (Sigma Aldrich), 2% human peripheral blood plasma (stem cell technologies), 10 µg/ml Insulin (Sigma Aldrich), 3U/ml Heparin (Sigma Aldrich), 200 mg/ml Holo-Transferrin (Sigma Aldrich), 10 ng/ml stem cell factor SCF (Miltenyl biotech), 1 ng/ml IL3 (Stem Cell Technologies), 3U/ml EPO and 1% P/S. This media was used from day 0 to day 6, then deprived from IL3 from day 7 to day 10. From day 11 to day 14, Stem cell factor was removed and EPO was used at 0.1 u/ml.

Viable cells were counted in triplicate using the trypan blue dye exclusion test as a function of time in culture.

Erythroid differentiation and apoptosis.

Sorting of erythroblasts at BFUe and CFUe stages. Synchronization of erythroid cells is required to compare the relative protein levels at a specific stage of differentiation. The cells are cultured in complex medium and sorted according to the well established method²¹. For these experiments, the BFUe cells were sorted on the labeling: IL3R⁻/CD34⁺/CD36⁻ and CFUe cells, on IL3R⁻/CD34⁻/CD36⁺.

Erythroid differentiation was also evaluated by flow cytometry (BD Biosciences Influx San Jose, CA, USA). 10 000 at 5 000 000 human primitive cultured erythroid cells were immunophenotyped from D5 to D14 using several antibodies: PC7 or PE conjugated CD34 (Beckman coulter, Brea, CA, USA), APC conjugated CD36 (BD Biosciences San Jose, CA, USA), PE/Cy7 conjugated IL-3R (Miltenyi, Paris, France), GPA (Life technologies Carlsbad, CA, USA) APC conjugated Band 3 (kindly provided by Mohandas Narla lab, New York, USA), PE conjugated α4 integrin (Miltenyi, Paris, France). For determining apoptosis, cells were stained with PerCP 5.5 conjugated Annexin V and with DAPI (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's protocol (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). FACS analysis was conducted on a BD Biosciences Influx flow cytometer (BD Biosciences San Jose, CA, USA). Data were analysed using Kaluza software (Beckman coulter, Brea, CA, USA). Isotype controls were obtained from Becton Dickinson (Le Pont de Claix, France).

Lentiviral vectors and infection. The established shRNA constructs targeting RPS19, RPL5 and RPL11 and p53 have been previously generated by our group²⁰. Established HSP70 cDNA sequence was used from¹⁸. We modified the pTRIP zephyr-PGK-EGFP-WPRE (kindly provided by Michaela Fontenay lab, Cochin Institute, Paris, France) with an m-Cherry reporter sequence instead of an EGFP for cell sorting of the positive cells for both GFP (shSCR-, shRPS19- shRPL5- or shRPL11-RNA infected cells) and m-Cherry (wild type cDNA HSP70 overexpressing cells).

For production of lentivirus, 293T cells were transfected with the appropriate viral packaging and genomic vectors (p-VSV-G and pCMV) using Jet Prime reagent according to the manufacturer's protocol (Polyplus-transfection Inc., New York, NY, USA). After 24 hours and two centrifugations at 5000g and then 20000g during 1 h at 4°C, virus pellets have been

collected. Viral particles were quantified by flow cytometry on BD CANTO I/II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

For lentiviral transduction, CD34⁺ cells were cultured for 2 days in the presence of 10% FBS, 100 U/ml IL-3, 10ng/ml IL-6 (Miltenyi, Paris, France), 25ng/ml SCF (Biovitrum AB, Stockholm, Sweden) 10ng/ml thrombopoietin (Kirin, Tokyo, Japan) and 10ng/ml Flt3-L (Celldex Therapeutics, Inc., Needham, USA). Infection was performed at a multiplicity of Infection (MOI) of 50. In the case of shRNA-RPS19, a second transduction was performed 6h after the first transduction in order to increase in the level of the RPS19mRNA inhibition. The effectiveness of shRNA in down regulating specific mRNA and the protein was assessed two days following isolation of sorted cells (**Suppl 5**).

For rescue experiments, erythroid cells were co-transduced with shRNAs targeting ribosomal proteins with either pTRIP-ZEPHYR-mCherry control, pTRIP-ZEPHYR-HSP70-mCherry, which contains the wild type HSP70 cDNA or with lentivirus control p53 and shp53 described in published article (Moniz and al, Cell death and disease 2011). Cells were cultured for 2 additional days and GFP alone, mCherry alone and GFP-mCherry double positives cells were sorted on BD Influx.

Proteasome inhibition and proteosomal activity measurement. The proteasome of human primary cells was inhibited by the following proteasome inhibitors: Lactacystin (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), MG132 (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) or Bortezomib (Millennium Pharmaceuticals, Inc, Cambridge, Massachusetts, USA). Cells were incubated in the culture medium with either Lactacystin at 50 μ M for 5 hours or MG132 at 10 mM for 2 hours or Bortezomib at 2.5 ng/mL for 6 hours. The proteosomal activity was evaluated using Fluorogenic assay according to the manufacturer's instruction (APT 280, Merck-Millipore, Darmstadt, Germany). The proteosomal activity test has been measured using PerkinElmer En spire Reader at 560nm.

Caspase Inhibition The caspase degradation of primary cells at day 7 was inhibited by general caspase inhibitor Z-VAD-FMK (R&D systems, Minneapolis, MN, USA). Cells were incubated in the culture medium with Z-VAD at 50 μ M for 2 hours.

p53 induction. The primitive human erythroid cells in culture at day 7 were treated with 5 or 10 or 20 μ M of the well-know p53 activator, the nutlin 3A (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) during 1 or 2 or 3 hours compare to the same cells culture without nutlin 3A or with the inactive enantiomer molecule nutlin 3B (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) as negative control.

Quantitative RT-PCR. Total RNA was extracted using TRIzol Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and treated with Rnase-Free Dnase (Qiagen, Courtaboeuf, France). The quality of the RNA was verified on an agarose gel and quantified with a Nanodrop spectrophotometer (ND-1000 UV-Vis) (Thermo Scientific, Wilmington, USA). RNA quality was assessed by 260:280 absorbance ratio and agarose gel electrophoresis. Reverse transcription was carried out from 500 ng total RNA using superscript II RNase H-Reverse transcriptase kit (Invitrogen). Real-time PCR was performed using the ABI 7900 Real time PCR system and Taqman PCR mastermix (Life technologies Carlsbad, CA, USA). Quantification of gene amplification was performed in duplicate using $\Delta\Delta$ Ct method. The

expression level of each gene was normalized using three housekeeping genes - hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase (*HPRT*) gene, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) gene and $\beta 2$ microglobulin (*$\beta 2$ microglobulin*) gene. Primers and internal probes used for quantitative RT-PCR are listed in **supplemental table 3**.

Western Blotting. 50,000 cells were harvested during erythroid time course, washed twice in 1X PBS and re-suspended in Laemmli buffer (100 mM Tris pH6.8, 10% glycerol, 4% SDS, 0.2% blue Bromophenol, 20 mM dithiothreitol) and sonicated (five times, 15s) in ice water and boiled for 5 minutes. Samples were run on a tris glycine 10% SDS-PAGE resolving gel. Following electrophoresis, protein was transferred onto a PVDF membrane (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) and stained with Ponceau S solution (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) to quantify transferred proteins. Membranes were blocked with 4% milk and 1% bovine serum albumin TBS-Tween for 1 h and then stained on a rocker overnight at 4°C with the respective antibodies. Antibodies as follows, GATA1 N-terminal (ab173816 rabbitAb, Abcam, Cambridge, United Kingdom) and GATA1 C-Terminal (sc-1233, Santa Cruz, Dallas, Texas, USA), HSP70 mab (#ADI SPA 812, #ADI SPA 810, Enzo life sciences, Villeurban, France), HSP90 (#4877, Cell signaling, Danvers, Massachusetts, USA), HSP27 (#2402, cell signaling), p53 (#5816, sigma), phospho-p53 (ser15) (Cell signaling) caspase 3, and its cleaved form, Bcl-XI, PARP and its cleaved form antibodies (all rabbit polyclonal antibodies from Cell signaling), β -actin antibody (Ac-15) (Sigma-Aldrich), RPS19 (#57643, Abcam), RPL5 (#74744, Abcam), and the polyclonal antibody against RPL11 (kindly provided by M.F O' Donohue (P.E Gleize 's group, LBME, Paul Sabatier University, Toulouse, France) were used at the appropriate dilution. Following several washes with TBST 1X, membranes were incubated with appropriate secondary antibodies for 1 hour. After several washes with TBST 1X, the membranes were soaked in ECL solution (GE Healthcare) and the expression level of various proteins determined on the Amersham hyperfilmTM ECL (GE Healthcare).

Protein synthesis. UT-7 cells were washed with warm 1X PBS and incubated with methionine-free RPMI medium (R7513, Sigma Aldrich) with 10% FBS and 2 mM L-Glutamine for 1 h at 37°C, 5% CO₂ to deplete methionine.

For metabolic labelling of protein using S^{35*} radioactive isotope, 250 μ Ci of methionine cysteine S³⁵ were added (pulse). Then the cells are replaced in complete medium containing methionine cysteine (chase). The protein extracts were obtained by addition of lysis buffer 50 mM Hepes pH7, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 1mM EGTA, 10 mM Sodium Pyrophosphate, 100 mM NaF, 10 mM DTT, 10 μ g/mL aprotinin, 10 μ g/mL leupeptin, 1mM PMSF and 1mM Vanadate. Immunoprecipitation was performed using primary antibodies against pAb HSP70 (ADI SPA812, Enzo life sciences) and actin (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). The gel containing protein was placed in a cassette with radioactive sensitive film (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, USA). The newly synthesized proteins were detected after 5 days using the Curix 60, AGFA.

We used another technique in order to validate the protein synthesis of HSP70 in human erythroid cells after inhibition of RPS19, or RPL5 or RPL11. Click-iT AHA (L-azidohoalanine, Ref 10102, Life technologies Carlsbad, CA, USA) was added at a final concentration of 40 μ M for 4 hours at 37°C and 5% CO₂, followed by cell harvesting, washed twice in 1X PBS, re-suspended in lysis buffer (1% SDS 50 mM Tris HCl at pH8)

supplemented with 1X complete protease inhibitor cocktail (Roche, Bale, Switzerland) and incubated for 30 minutes on ice. After centrifugation at 18,000g for 10 minutes at 4°C, the remaining supernatant was transferred in new tube. 25 µg of protein lysate was used for the click-iT reaction with biotin alkyne (B10185, Life Technologies) using the click-iT Protein Reaction Buffer kit (C10276, Invitrogen) in a total volume of 200 µl for 1 h at 4°C according to the manufacture's instructions. The click-iT reaction is revealed using biotin-streptavidin system (Life technologies) using western blot.

Immunoprecipitation of HSP70 and ubiquitin proteins. The UT-7 cells cultured in the presence of EPO were treated/untreated with MG-132 during 5 hours of culture. Protein cell extracts of 5 million of cells were obtained using lysis buffer: 150 mM NaCl, 20 mM Tris HCl pH8, 0.2% NP40, 10% glycerol, 2 mM EDTA, 20 mM NaF and protease inhibitor cocktail (Complete, Roche). During all the experiments, MG132 is maintained at 10 mM. Whole cell lysates were used for immunoprecipitation conducted with 5mg per sample of a goat polyclonal antibody against HSP70 (SPA812, Enzo life science) bound beads from ImmunoCruz system (sc-45040, Santa Cruz) or 5mg per sample of an anti-ubiquitin mab-agarose (D058-8, MBL) and incubated overnight on rotor at 4°C. The beads-antibody-antigen complex was washed five times with lysis buffer containing protease inhibitor. The extracts were boiled in Laemmli buffer for 5 minutes and then loaded on gel. The protein-protein interactions have been revealed by western blotting.

Confocal microscopy and combined flow cytometry and immunofluorescence technologies by AMNIS.

Confocal microscopy. The cells were fixed in 4% paraformaldehyde then permeabilized in 0.2% Triton-X. The staining was performed using antibody against HSP70 (ADI SPA 810 mouse mAb, Enzo life technologies) and GATA1 N-terminal (ab173816 rabbit pAb, Abcam). The secondary antibody staining was performed using Alexa fluor 568 goat anti-mouse and Alexa fluor 647 goat anti-rabbit respectively.

Amnis technology. The cells (1 to 2×10^6) were fixed and permeabilized using Foxp3 staining Buffer Set according to the manufacturer's instructions (00-5523-00, Affymetrix Santa Clara, CA, USA). The stainings were performed using primary antibody against HSP70 (ADI SPA812 pAb and ADI SPA810 mAb, Enzo life technologies), GATA1 N-terminal (ab173816 mAb, Abcam), Hemoglobin (Hbb, Santa Cruz sc-21757), SUMO1 (33-2400mAb, Thermo Scientific) PML (sc-966 clone PG-M3 Santa Cruz) SUMO2/3 (PA5-20959 pAb, Thermo scientific). The secondary antibody staining was performed using Alexa fluor 568 goat anti-mouse and Alexa fluor 647 goat anti-rabbit.

Cells were stained with DAPI for 5min at room temperature in a total volume of 50µl and acquisitions were directly performed. The data were analyzed on an Imagestream ISX mkII and a 60x magnification was used for all acquisitions. Between 30,000 and 50,000 events were collected in all experiments. Single stain controls were run for each fluorochrome used and spectral compensation was performed in IDEASTM software. Specific masks were designed for the analysis of the nucleus or the cytoplasm localization of HSP70, GATA-1 and Hbb. Results were expressed as intensity value which is the sum of the background subtracted pixel values within the masked area of the image or as mean pixel intensity value which is the mean of the background-subtracted pixels contained in the input mask (computed as Intensity/number of pixels). These results are normalized to surface area.

Statistical analysis.

Statistical analyses were performed with GraphPAD Prism (version 5.0 ; GraphPAD software). The data are expressed as the mean \pm s.e.m of n determinations unless noted otherwise. Student's t-test or the Mann-Witney tests were used to compare the data from different populations. Differences were considered significant at a P value <0.05 (*), <0.01 (**), <0.001 (***).

Figure 1

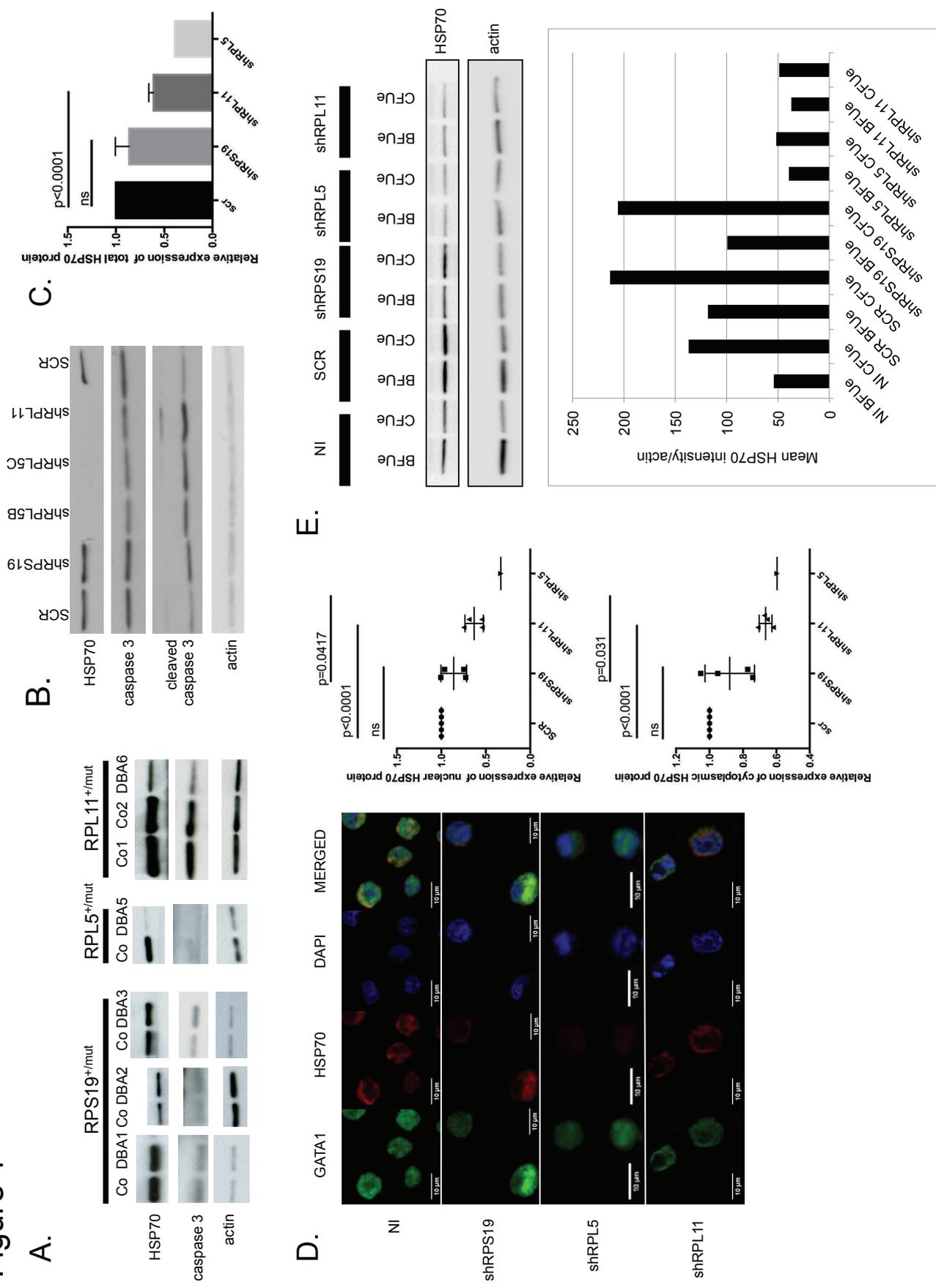


Figure 2

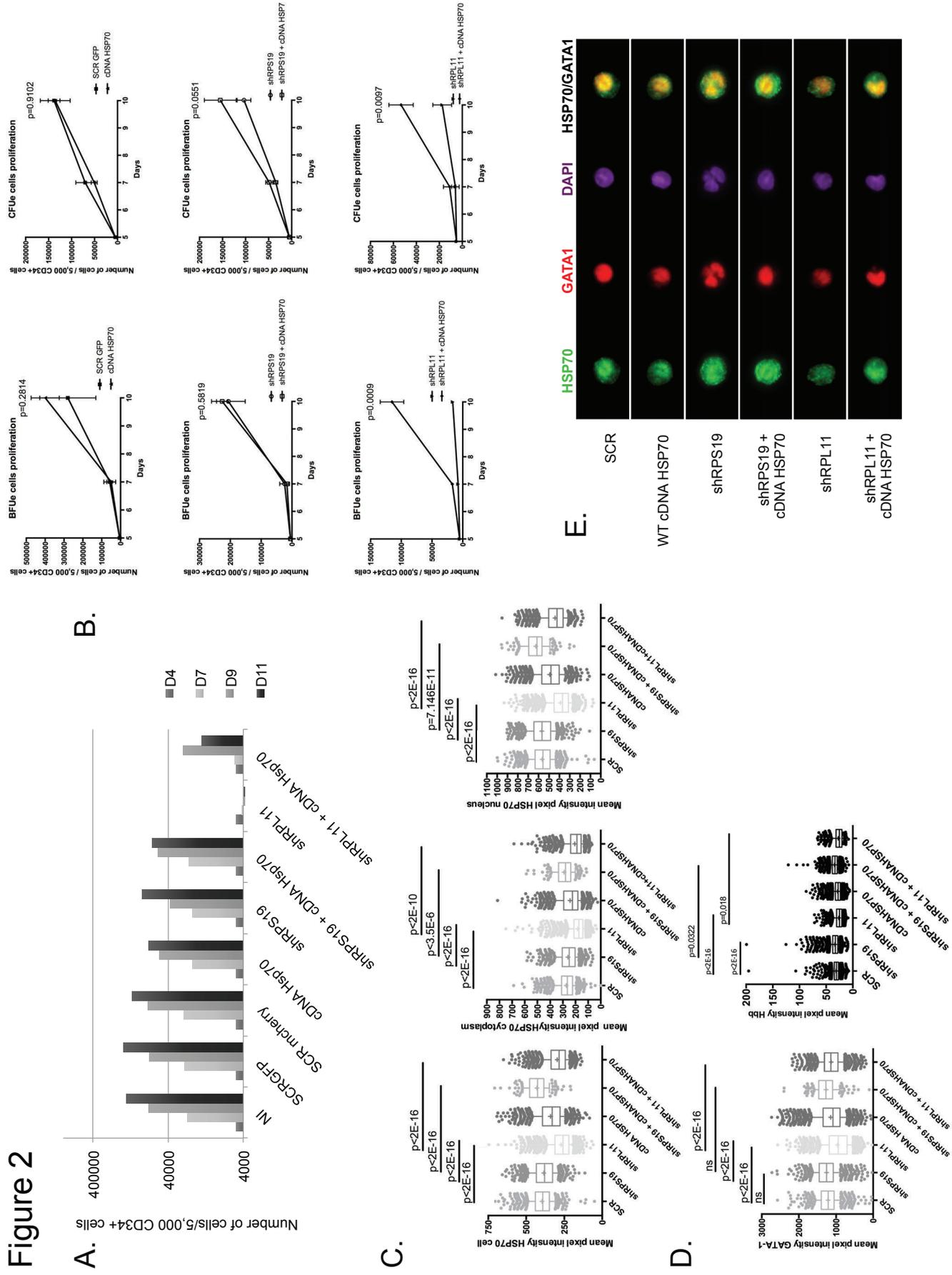


Figure 3

A.

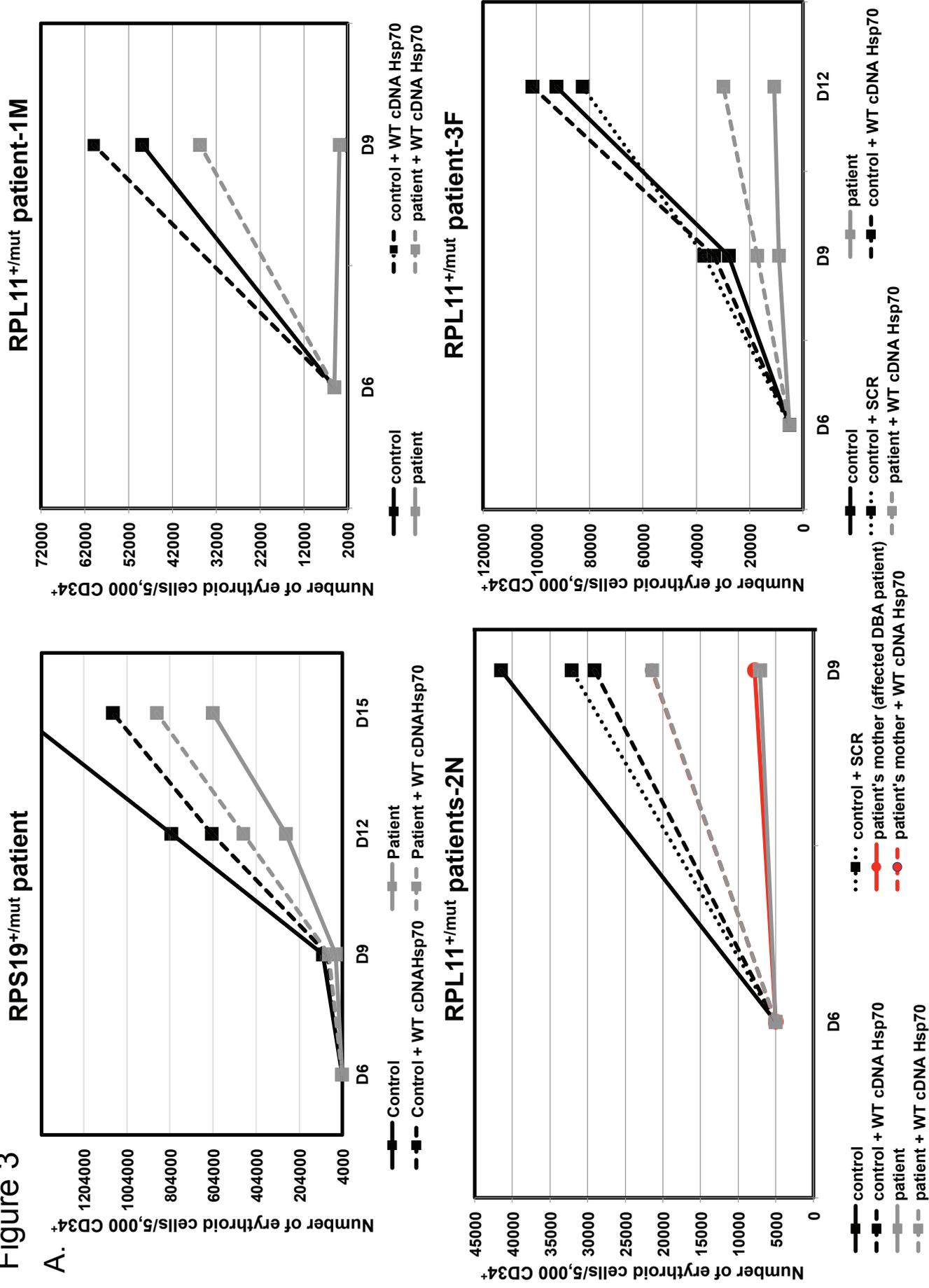
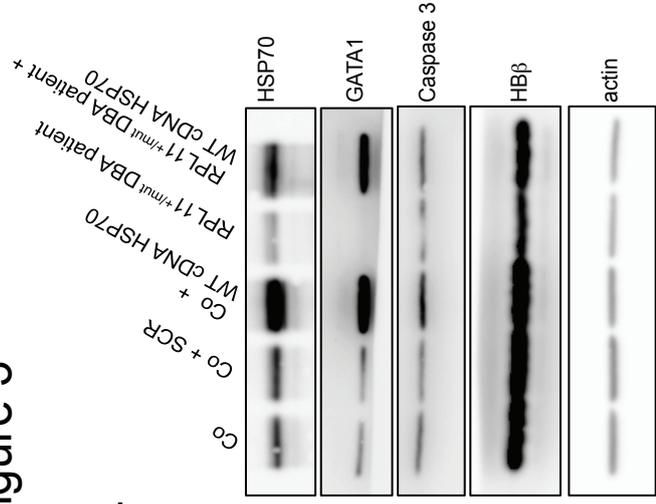


Figure 3

B.



C.

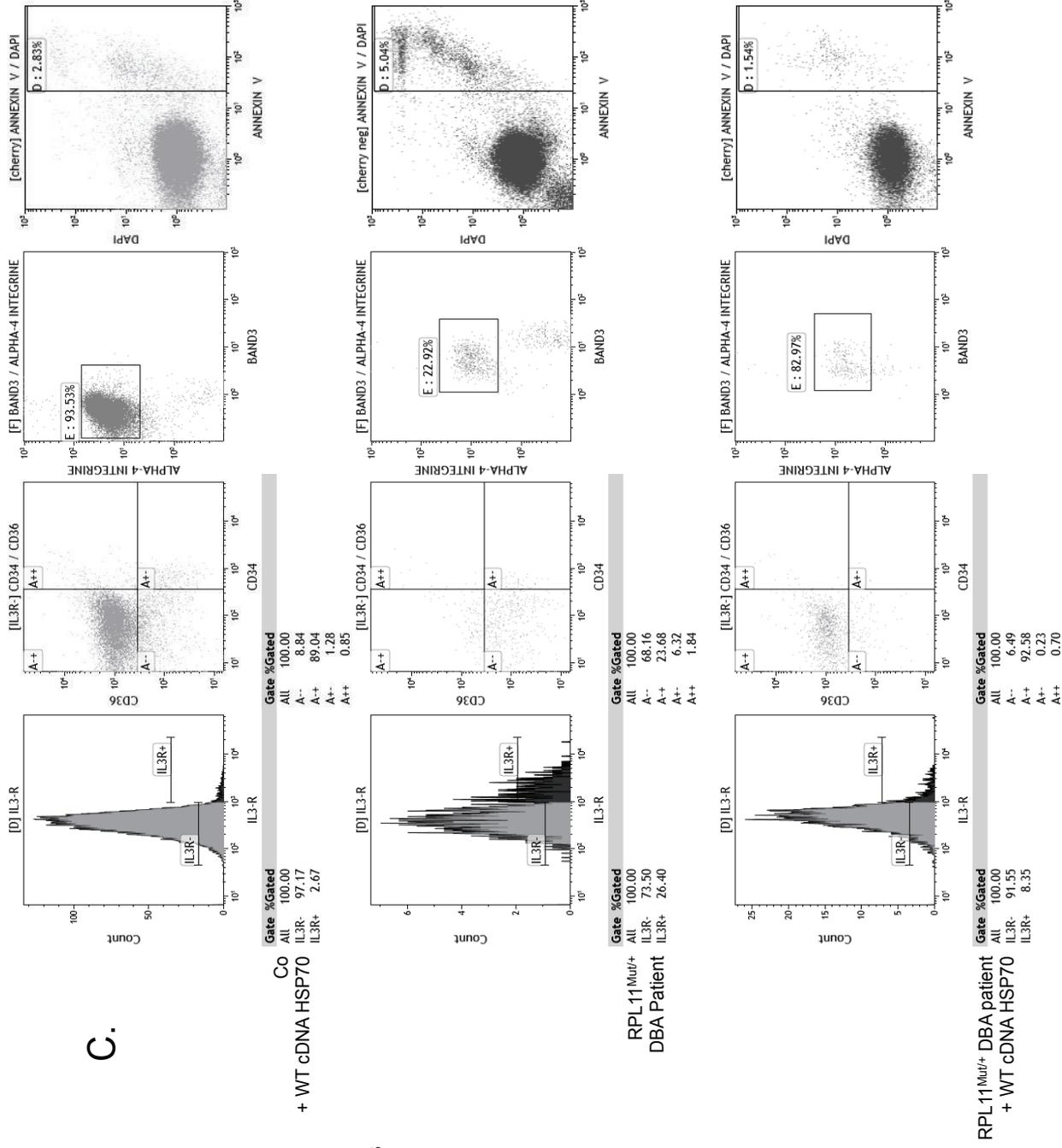


Figure 4

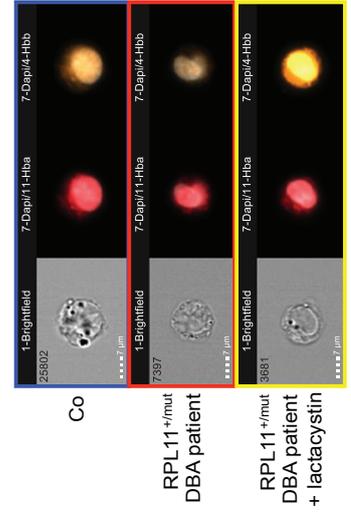
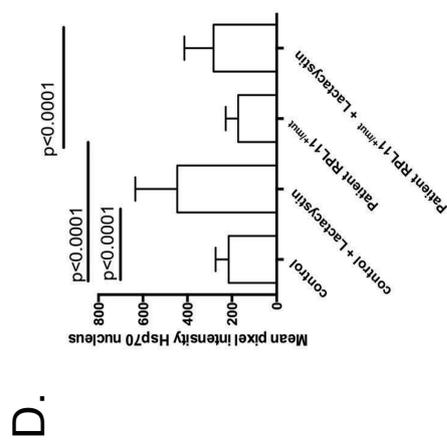
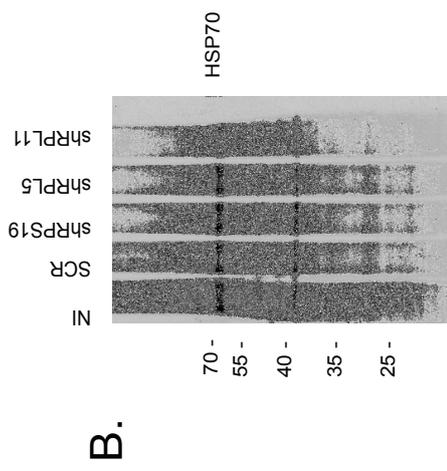
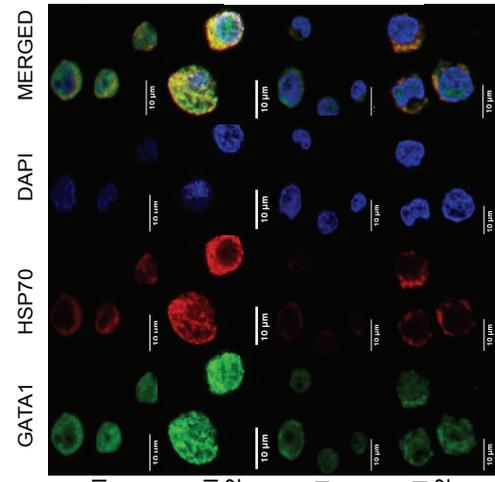
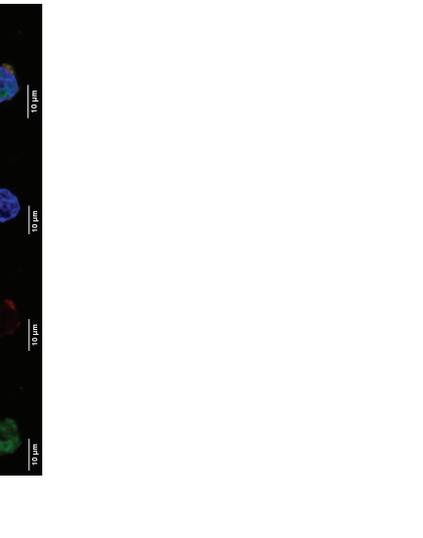
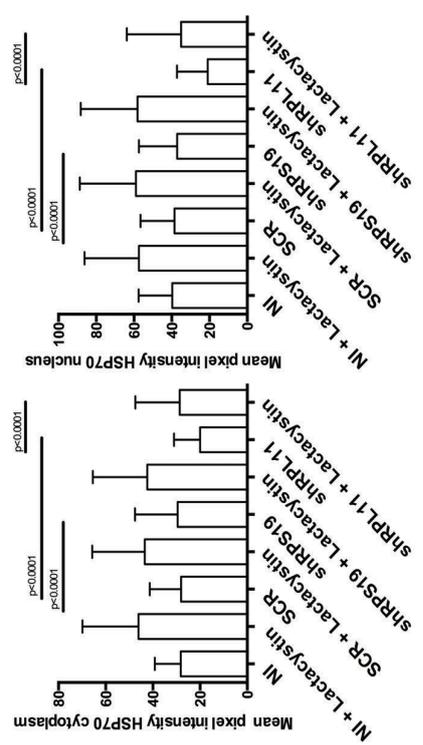
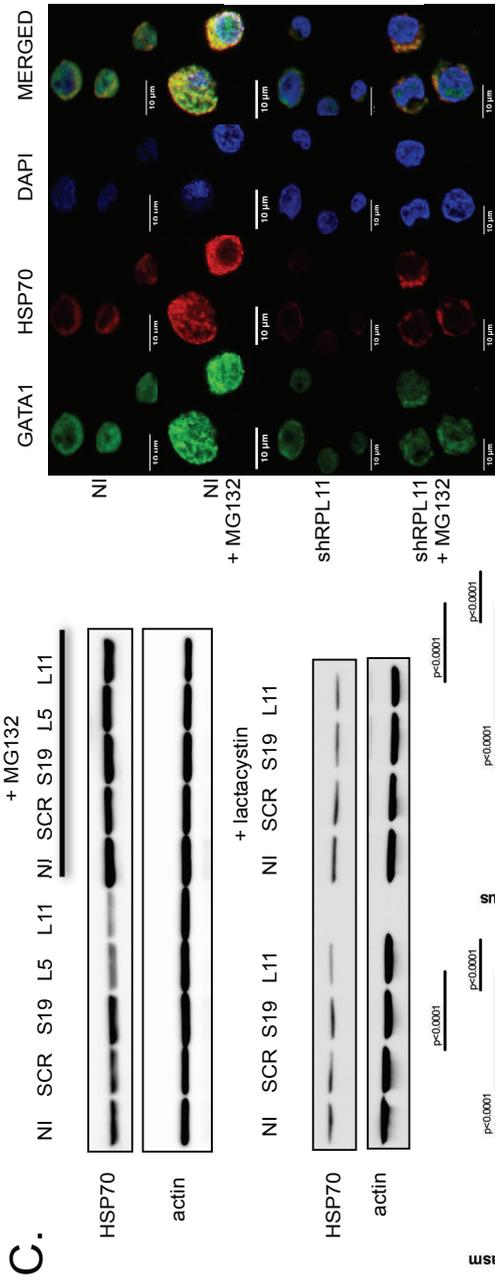
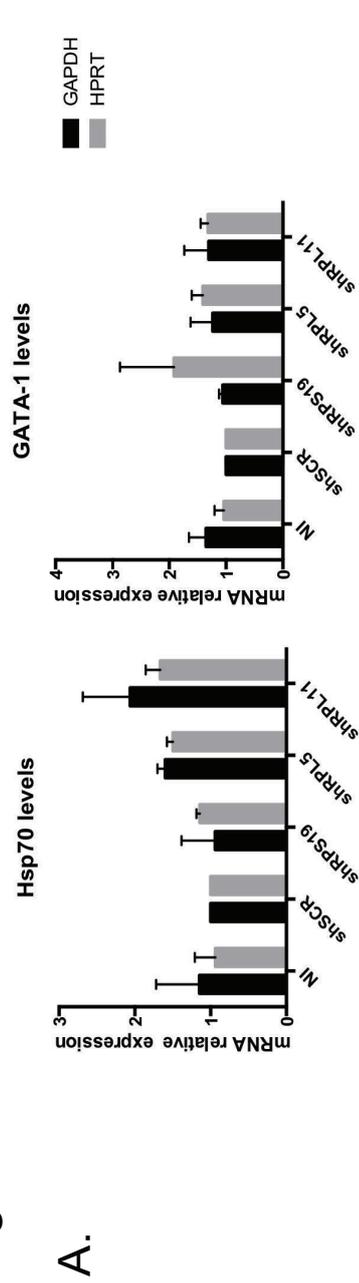


Figure 5

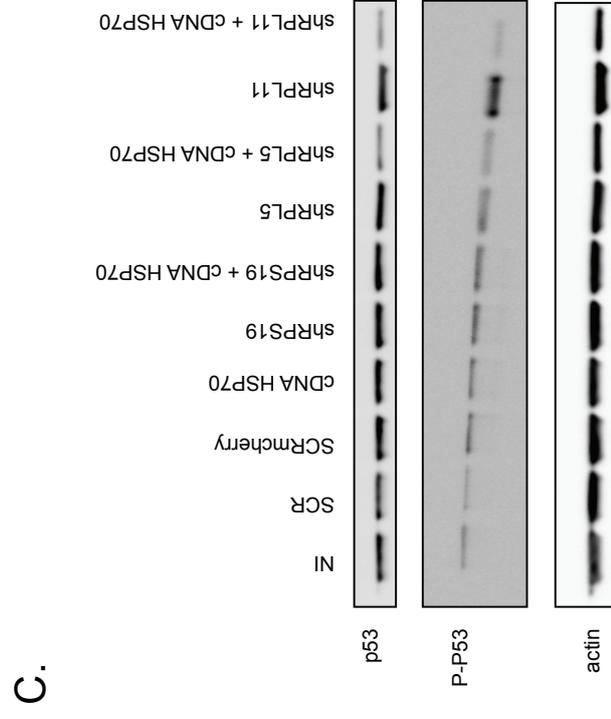
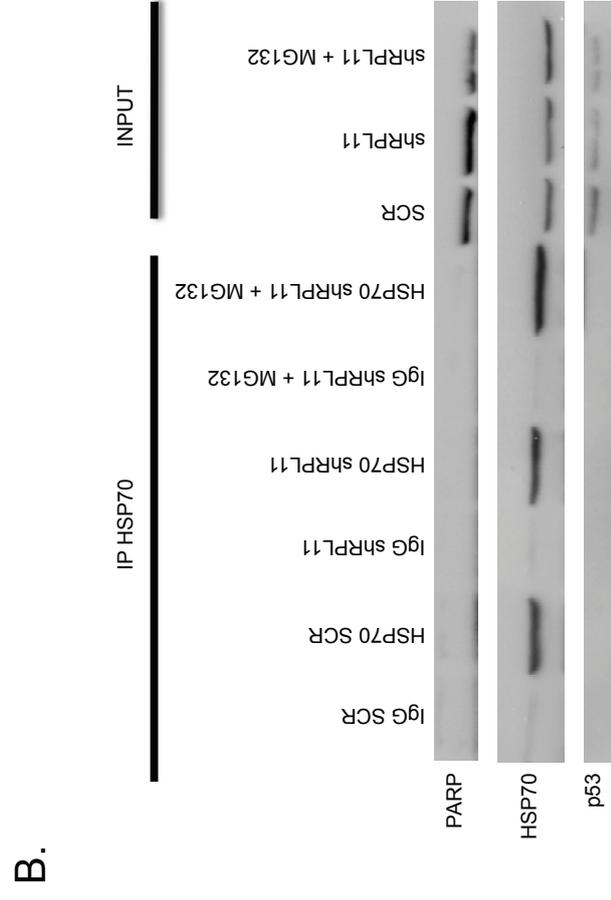
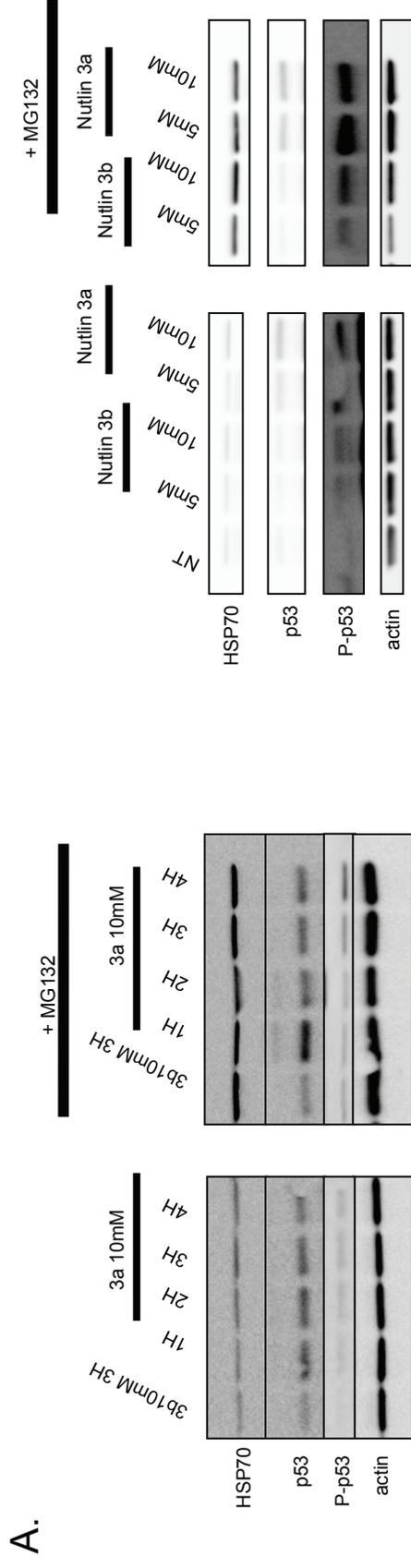
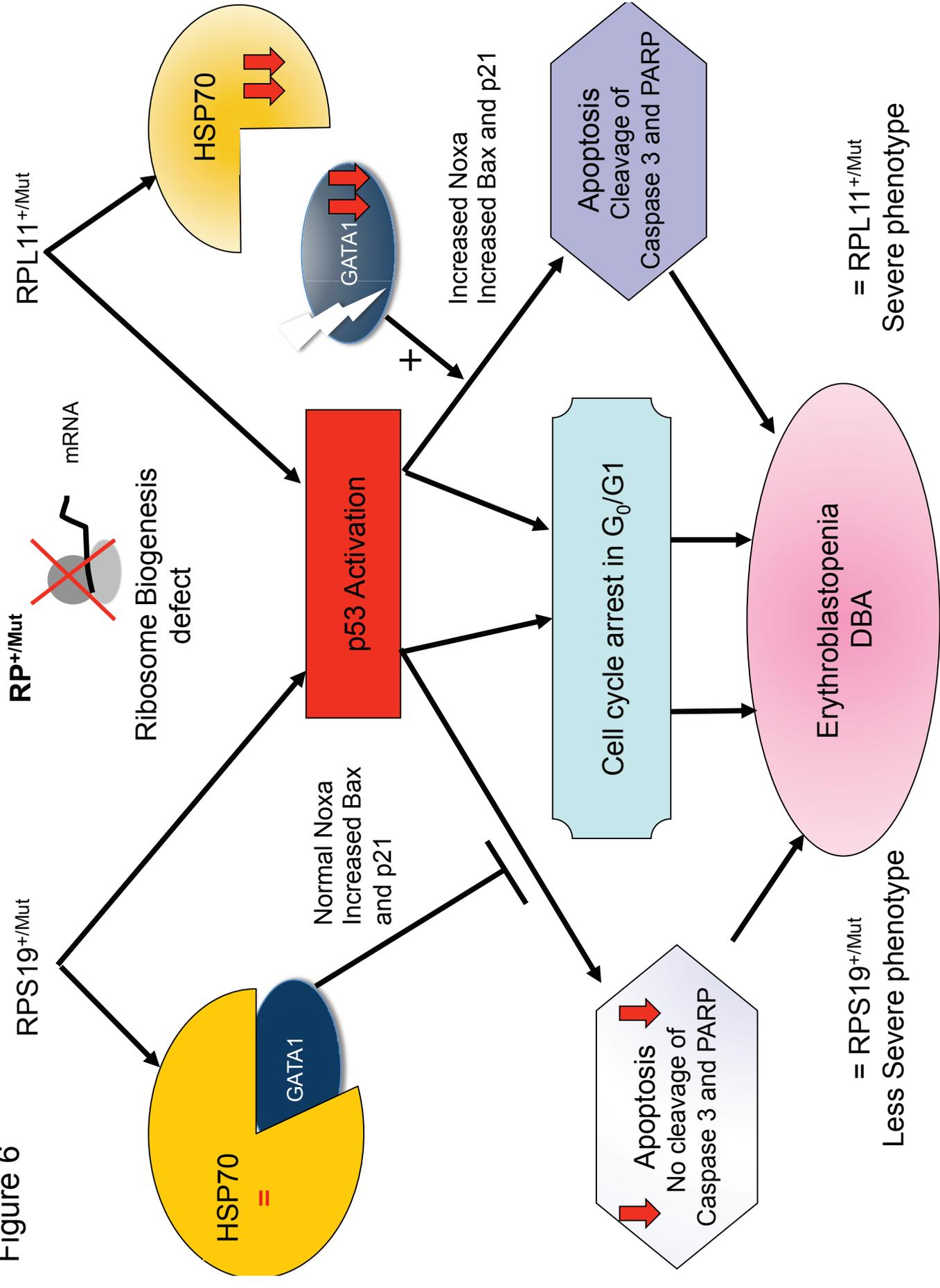


Figure 6

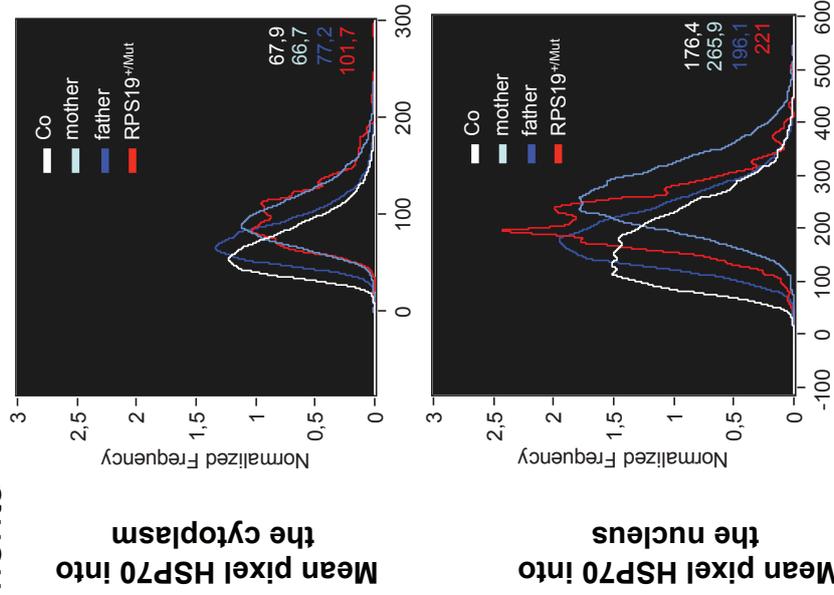


Supplemental

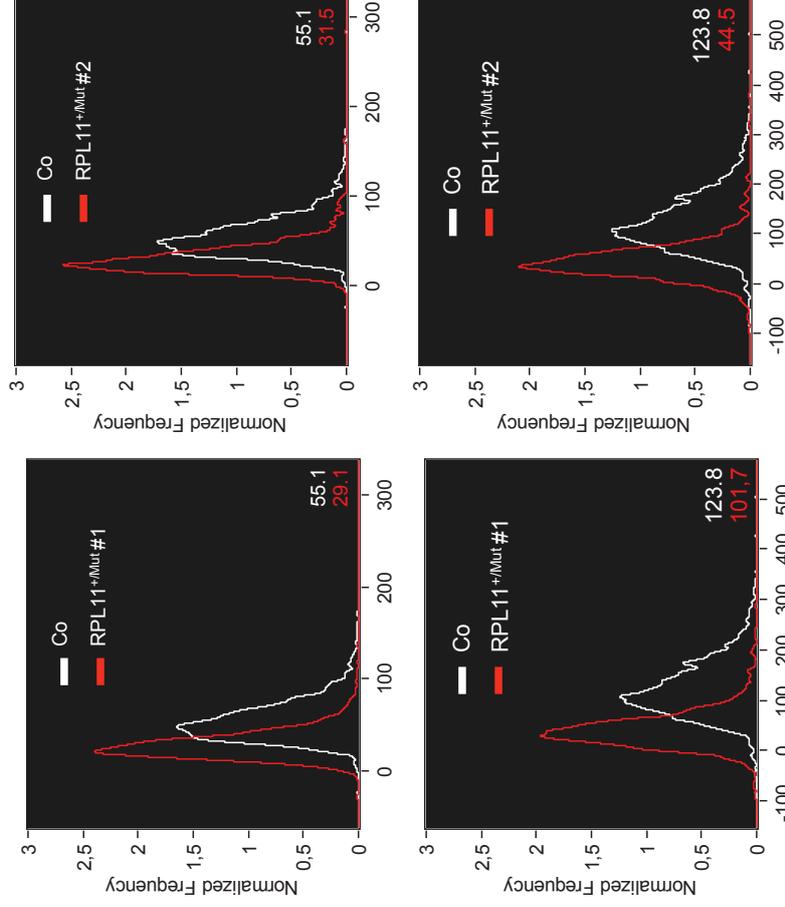
- **fig. Suppl 1:** HSP70 expression level and subcellular repartition in DBA patients; effect of HSP70 overexpression on Hb expression level in RPL11^{+/^{Mut}} DBA patients
- **fig. Suppl 2:** Specificity of the erythroid HSP70 defect in DBA
 - 1A: EBV cell lines from various DBA patients
 - 1B: analysis of the expression level of other HSP
- **fig. Supp 3:** HSP70 is polyubiquitinated
- **fig Supp 4:** proteasomal activity in the DBA model
- **fig Supp 5:** efficiency of the various shRNA-RPS19, -RPL5, -RPL11 (Q-RT-PCR)

Supplemental 1

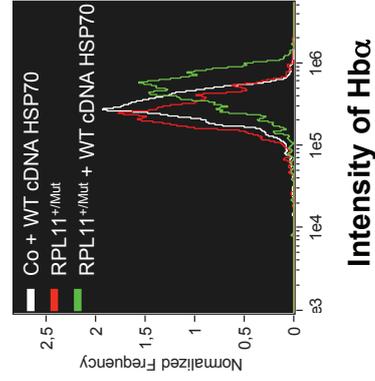
RPS19^{+/-}/mut DBA patient



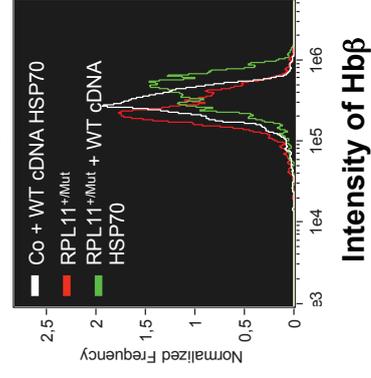
RPL11^{+/-}/mut DBA patients



RPL11^{+/-}/mut DBA patient (son)-2N



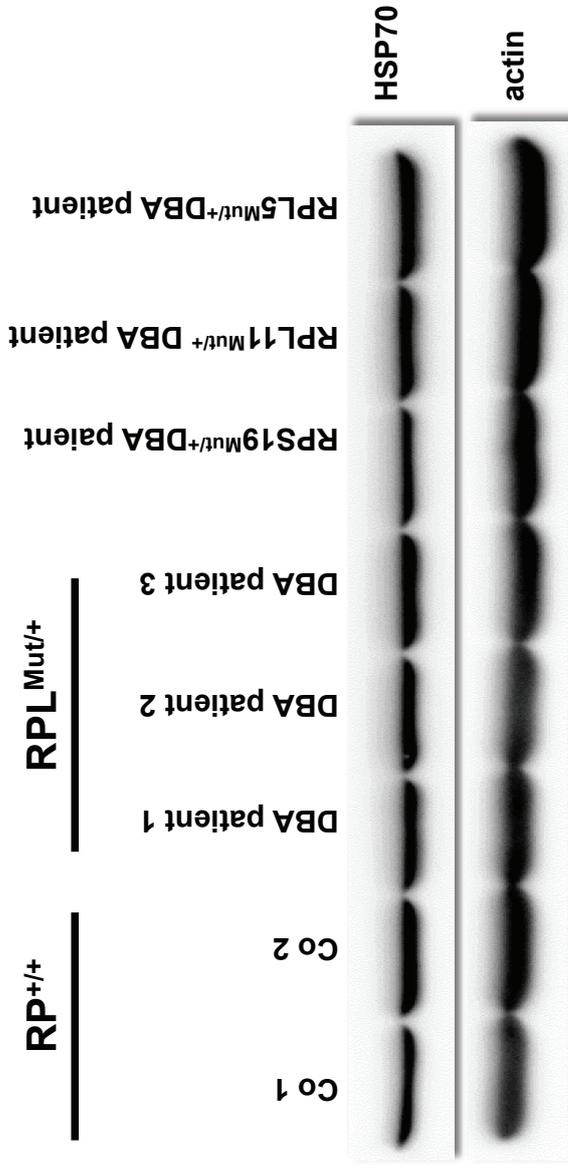
RPL11^{+/-}/mut DBA patient (mother)-2N



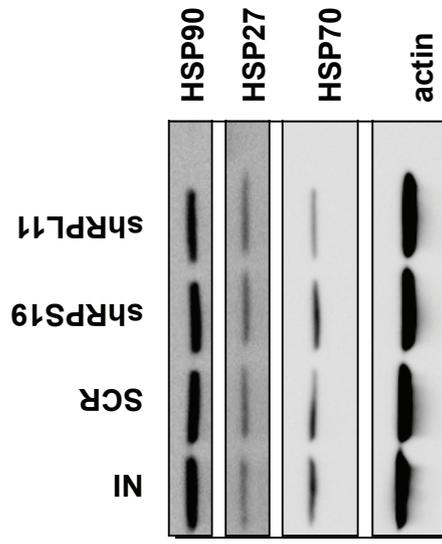
B.

Supplemental 2

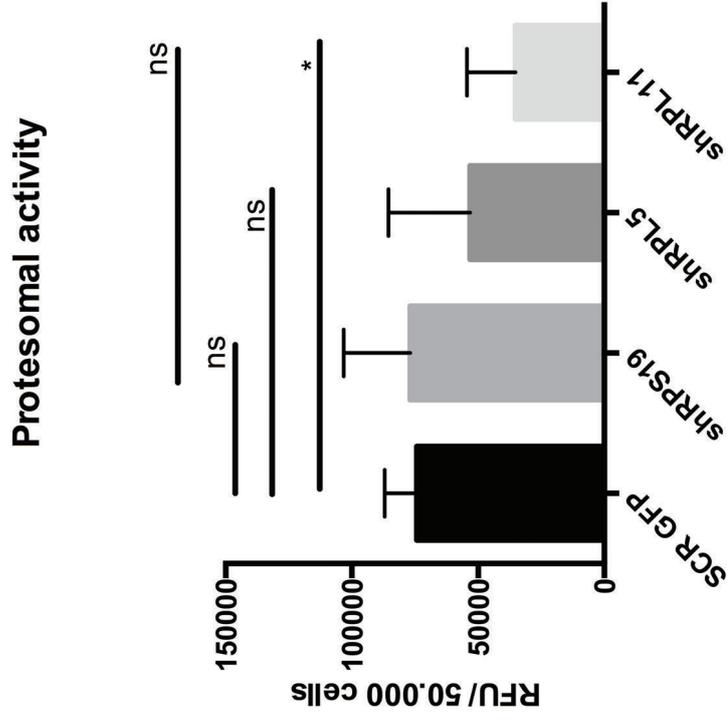
A.



B.



Supplemental 4



Supplemental 5

