



HAL
open science

Rôle de l'histone désacétylase HDAC6 au cours de l'érythropoïèse humaine

Pascal Vong

► **To cite this version:**

Pascal Vong. Rôle de l'histone désacétylase HDAC6 au cours de l'érythropoïèse humaine. Biologie cellulaire. Université de Picardie Jules Verne, 2022. Français. NNT : 2022AMIE0051 . tel-04147742

HAL Id: tel-04147742

<https://theses.hal.science/tel-04147742>

Submitted on 1 Jul 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Thèse de Doctorat

*Mention Biologie Santé
Spécialité Biologie cellulaire et moléculaire*

présentée à l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

Pascal VONG

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

*Rôle de l'histone désacétylase HDAC6 au cours de
l'érythropoïèse humaine*

Soutenue le 28 mars 2022, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M. J.-P. MAROLLEAU, Professeur, UPJV

M. M. OSTUNI, Professeur, Université de Paris

M. S. GIRAUDIER, Professeur, Université de Paris

M^{me} F. VERDIER, Directrice de recherche, Université de Paris

M^{me} L. DA COSTA, Professeur, Université de Paris

M. L. GARÇON, Professeur, UPJV

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Remerciements

Aux membres du jury,

À Monsieur le Professeur Jean-Pierre Marolleau, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury de thèse, veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

À Monsieur le Professeur Mariano Ostuni, pour l'honneur de vous compter parmi les membres de mon jury et d'avoir accepté de relire mon travail, veuillez recevoir mes remerciements les plus sincères et soyez assuré de mon profond respect.

À Monsieur le Professeur Stéphane Giraudier, pour me faire l'honneur de participer à ce jury et d'avoir accepté d'examiner mon travail, soyez assuré de ma reconnaissance et de mon respect le plus sincère.

À Madame le Docteur Frédérique Verdier, pour avoir suivi mon projet au fil des années, je vous exprime toute ma gratitude. Vos mots d'encouragement et vos commentaires détaillés et judicieux ont été importants pour moi. Aujourd'hui encore, je vous remercie d'avoir accepté de participer à ma soutenance de thèse.

À Madame le Professeur Lydie Da Costa, pour m'avoir fait l'honneur d'être présente à mon jury et d'examiner mes travaux, veuillez trouver l'expression de mes sincères remerciements.

À mon directeur de thèse, le Professeur Loïc Garçon, pour sa patience, son soutien et ses conseils. J'ai grandement bénéficié de votre expertise et de vos révisions méticuleuses. Je vous suis extrêmement reconnaissant de m'avoir accepté comme doctorant et d'avoir continué à avoir confiance en moi au fil des ans.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres d'HEMATIM qui m'ont soutenu dans la réalisation de cette thèse. Ainsi, je remercie Hakim, pour ton aide inestimable, autant morale que professionnelle durant toutes ces années que j'ai passées dans l'équipe. Je n'oublierai pas ton acharnement inspirant, ton sens de la débrouille, ton amitié ainsi que le soutien indispensable que tu apportes à tous au sein du laboratoire. Merci aussi à Kahia pour sa

gentillesse et ses conseils très utiles au cours de mes premières années de thèse. J'espère que la petite Inès héritera de toutes vos qualités humaines.

Merci beaucoup au Professeur Rochette pour vos relectures, vos conseils précieux, et toutes vos perspectives inspirantes. J'ai apprécié nos discussions sur la thèse, la science en général ou celles moins sérieuses portant sur des affaires mondaines sans queue ni tête. À Alexis, merci pour nos discussions et tes idées éclairantes. À Eya, merci pour ta gentillesse et tes délicieux gâteaux. À Louison, merci pour ton humour et ta bonne humeur contagieuse et à Magalie, pour ta gentillesse et ton calme rassurant. À Nicolas, merci pour ta collaboration précieuse et nos discussions qui ont animé nos quotidiens en salle de biochimie. Je te souhaite plein de courage pour ta thèse et une belle carrière devant toi. À Walaa, beaucoup de mercis me viennent également en tête, pour ton amitié, tes plats libanais, tes conseils divers, tes CD34⁺... Je n'oublierai pas. Je te souhaite de t'épanouir avec ton mari aux États-Unis. À Yohann, merci de ta sympathie et de tes explications techniques très claires qui m'ont beaucoup aidé dans cette thèse. À Camille la pédiatre, Camille la biologiste, Cathy, Jessica, Marie, Stéphane et toutes les personnes du laboratoire avec qui j'ai partagé de nombreuses discussions scientifiques autour de nos travaux mais aussi les moments de détente, les goûters et les célébrations des fêtes qui ont illuminé nos quotidiens, je vous adresse un grand merci.

À ma famille et à mes amis, je vous remercie infiniment de votre soutien.

Table des matières

Table des figures	7
Table des tableaux	8
Liste des abréviations et acronymes	9
INTRODUCTION	16
I. Les histones désacétylases (HDAC)	16
I.1. Les HDAC : découverte et classification	16
I.1.1. Découverte des HDAC.....	16
I.1.2. Classification des HDAC	16
I.2. HDAC6, généralités et structure protéique	19
I.2.1. Généralités	19
I.2.2. Structure protéique d'HDAC6	20
I.3. Mécanismes d'action catalytique des HDAC	22
I.3.1. Classe I.....	22
I.3.2. Classe IIa.....	24
I.3.3. Classe IIb et cas particulier d'HDAC6.....	25
I.3.4. Classe III	27
I.4. Rôle des HAT et des HDAC dans la régulation de l'expression génique.....	28
I.4.1. Acétylation/Désacétylation des histones.....	28
I.4.2. Acétylation/Désacétylation des substrats non-histones.....	30
I.5. Fonctions biologiques d'HDAC6 associés aux substrats non-histones	31
I.5.1. Régulation de la dynamique du cytosquelette.....	33
I.5.2. Clairance des protéines mal repliées (misfolded) et ubiquitinylées du cytoplasme.....	35
I.5.3. Régulation de l'activité chaperonne d'HSP90	38
I.5.4. Régulation de l'apoptose.....	39
I.6. Les inhibiteurs des HDAC dans le traitement du cancer	40
II. Déroulement de l'érythropoïèse	42
II.1. Généralités	42
II.2. Érythropoïèse précoce : cellules souches hématopoïétiques et progéniteurs érythroïdes.....	44
II.2.1. Les cellules souches hématopoïétiques.....	44
II.2.2. Les progéniteurs érythroïdes.....	46
II.3. Différenciation érythroïde terminale	47
II.3.1. Les précurseurs érythroïdes	47
II.3.2. Rôle des modifications post-traductionnelles des histones dans la condensation nucléaire.....	48
II.3.3. Export et dégradation des protéines nucléaires.....	50
II.3.4. Énucléation	53
II.4. Les îlots érythroblastiques	56

II.4.1. Définition de l'îlot érythroblastique	56
II.4.2. Interactions entre les cellules érythroïdes en cours de maturation et le macrophage central au sein de l'îlot érythroblastique	56
II.5. Maturation des réticulocytes.....	58
II.5.1. Contrôle du volume cellulaire.....	59
II.5.2. Remodelage membranaire	60
II.5.3. Vésiculation	61
II.6. Caractérisation phénotypique des cellules érythroïdes au cours de leur maturation	62
III. Régulation de l'érythropoïèse	65
III.1. Régulation transcriptionnelle de l'érythropoïèse.....	65
III.1.1. GATA1, TAL1 et KLF1 : les principaux facteurs de transcription de l'érythropoïèse.....	65
III.1.2. GATA2.....	68
III.1.3. Les complexes LDB1 dans la transcription des gènes érythroïdes.....	68
III.2. Régulation traductionnelle de l'érythropoïèse.....	70
III.2.1. Régulation des ribosomes et ribosomopathies.....	70
III.2.2. Rôle des protéines de liaison à l'ARN dans la régulation de l'initiation de la traduction. 72	
III.2.3. Recyclage des ribosomes et homéostasie ribosomale	73
III.3. Biosynthèse de l'hème et régulation de l'équilibre de synthèse entre l'hème et l'hémoglobine	74
III.3.1. Biosynthèse de l'hème.....	74
III.3.2. Rôles régulateurs de l'hème sur la synthèse des chaînes de globine.....	75
III.3.3. HSP70 dans la balance hème/globine.....	77
III.4. Régulations réciproques entre le fer et l'érythropoïèse	77
III.4.1. Absorption, cycle et distribution du fer dans l'organisme	77
III.4.2. Absorption et métabolisme du fer dans l'érythroblaste	79
III.4.3. Régulation du fer par les érythroblastes	80
III.4.4. Régulation de l'érythropoïèse par le taux de fer sérique	81
III.5. Rôle des cytokines EPO et SCF dans la régulation extrinsèque de l'érythropoïèse.....	82
III.5.1. Transduction du signal de l'érythropoïétine : principales voies de signalisation dépendantes de l'interaction EPO/EPOR dans l'érythropoïèse	82
III.5.2. Transduction du signal du SCF et coopération entre EPO/EPOR et SCF/c-KIT dans l'érythropoïèse.....	90
III.5.3. Régulation négative de la voie JAK2/STAT5 dans l'érythropoïèse.....	94
III.5.4. Un exemple de pathologie impliquant une hyperactivation de la voie JAK2/STAT5 : la polyglobulie de Vaquez.....	97
IV. Rôle des HDAC dans la régulation de l'hématopoïèse	99
IV.1. Les HDAC dans le maintien de l'homéostasie des CSH.....	99
IV.1.1. Classe I des HDAC dans le maintien de l'homéostasie des CSH	99
IV.1.2. Classes II et III des HDAC dans le maintien de l'homéostasie des CSH.....	100

IV.2. Les HDAC dans la régulation de l'érythropoïèse	102
IV.2.1. Classe I des HDAC dans la différenciation érythroïde terminale	102
IV.2.2. Classe II des HDAC dans la différenciation érythroïde terminale	104
IV.3. Les HDAC dans la régulation du gène de la γ -globine	105
IV.4. Rôle d'HDAC6 dans la production des plaquettes.....	107
OBJECTIF DU TRAVAIL	110
I. Contexte scientifique de l'étude.....	110
II. Objectif	111
MATÉRIEL ET MÉTHODES	113
I. Culture <i>in vitro</i> de cellules érythroïdes CD34 ⁺ humaines et de la lignée cellulaire UT7/EPO....	113
II. Cytométrie en flux	113
III. Imagerie en flux.....	113
IV. Production de particules lentivirales et transduction des cellules UT7/EPO	114
V. Immunoblots.....	114
VI. Extraction des protéines pour les expériences d'immunoprécipitation	116
VII. Immunoprécipitation, acétylation et analyse des interactions protéine-protéine par immunoblot	116
VIII. Enrichissement des protéines acétylées par immunoprécipitation pour l'analyse des acétylomes par spectrométrie de masse.....	116
IX. Etude des niveaux de phosphorylation des protéines par immunoblot ou cytométrie en flux ..	117
X. RQ-PCR.....	117
XI. Cytospin pour cytologie, microscopie en immunofluorescence	118
XII. Réactifs	119
XIII. Séquençage de l'ARN	119
XIV. Traitement des données et analyse d'expression différentielle des gènes (DGE).....	120
XV. Analyse statistique.....	120
RÉSULTATS	121
I. HDAC6 est exprimée et localisée dans le cytoplasme des cellules érythroïdes pendant la différenciation érythroïde humaine <i>in vitro</i>	121
II. Effets d'une inhibition pharmacologique d'HDAC6 sur la différenciation érythroïde humaine <i>in vitro</i>	123
III. Le retard de maturation érythroïde induit par l'exposition à l'ACY-1215 n'est pas dû à un excès d'apoptose, se produit au niveau transcriptomique et est associé à une modification globale du transcriptome des cellules érythroïdes	126
IV. Le knockdown d'HDAC6 dans la lignée cellulaire érythroleucémique UT7/EPO a réprimé la différenciation érythroïde au niveau transcriptionnel.....	129
V. Le knockdown d'HDAC6 dans les cellules UT7/EPO et son inhibition dans les cellules primaires érythroïdes ont inhibé la phosphorylation de JAK2 en réponse à l'EPO.....	131
VI. Profil acétylomique des érythroblastes humains après inhibition d'HDAC6	133

VII. La régulation du statut d'acétylation de la 14.3.3ζ par l'activité désacétylase d'HDAC6 contrôle les interactions JAK2/LNK dans les cellules érythroïdes humaines	135
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	139
BIBLIOGRAPHIE	149
ANNEXES	189
Annexe I : Séquence de la protéine HDAC6	190
Annexe II : Article 1	193
Annexe III: Article 2	224
Annexe IV: Article 3	257

Table des figures

Figure 1. Représentations des structures secondaires de l'arginase et de différentes enzymes de la famille des HDAC (HDLP, HDAC8, HDAC7 et HDAH)	17
Figure 2. HDAC6, localisation du gène hdac6 et ARN transcrit.	20
Figure 3. Représentation schématique des domaines fonctionnels d'HDAC6.....	21
Figure 4. Complexe HDLP- Zn ²⁺ -TSA.	22
Figure 5. Modèle de mécanisme de désacétylation catalysée par les HDAC dépendants du Zn ²⁺ proposé à partir de l'étude de la protéine HDLP	23
Figure 6. Modèle de mécanisme de désacétylation par les HDAC dépendants du Zn ²⁺ modifié et proposé à partir de l'étude d'HDAC8	24
Figure 7. Modèle de catalyse enzymatique proposé pour la désacétylation du résidu lysine au niveau du domaine CD2 d'HDAC6	27
Figure 8. L'acétylation de K40 protège les microtubules contre le risque de rupture mécanique	34
Figure 9. Clairance des protéines mal repliées ubiquitinylées.	38
Figure 10. Commutation Hb au niveau des loci α- et β-globine humains.	43
Figure 11. Étapes de la différenciation érythroïde.	44
Figure 12. Modèle redéfini de l'hématopoïèse humaine.	45
Figure 13. Condensation nucléaire et énucléation au cours de la maturation érythroïde terminale.	49
Figure 14. Rôle de WDR26 dans la condensation nucléaire et l'énucléation dans les érythroblastes en cours de maturation.	52
Figure 15. Modèle proposé pour la régulation de l'énucléation des érythroblastes médiée par PI3K... ..	54
Figure 16. Modèle illustrant le processus d'énucléation des érythroblastes.	55
Figure 17. L'îlot érythroblastique.	57
Figure 18. Rôle joué par les canaux ioniques Gardos (KCCN4), PIEZO1 et KCC1 dans le contrôle du volume cellulaire.	60
Figure 19. Remodelage membranaire.....	61
Figure 20. Processus de vésiculation.....	62
Figure 21. Expression de divers marqueurs de surface au cours de la maturation érythroïde.....	65
Figure 22. Expression des composants du complexe LDB1 au cours de la différenciation érythroïde à partir des cellules progénitrices hématopoïétiques.....	69
Figure 23. Absorption, cycle et distribution du fer dans l'organisme.....	79
Figure 24. Absorption du fer dans l'érythroblaste en développement	80
Figure 25. Activation des voies de signalisation intracellulaires par l'érythropoïétine (EPO).....	84
Figure 26. Organisation des domaines STAT.	85

Figure 27. Processus de formation des plaquettes dans la moelle osseuse	108
Figure 28. Représentation de la voie HDAC6/CTTN au cours de la formation des plaquettes chez l'homme	109
Figure 29. HDAC6 est exprimé au cours de la différenciation érythroïde humaine et est localisée dans le cytoplasme des cellules érythroïdes	122
Figure 30. Effets de l'inhibiteur pharmacologique d'HDAC6 (ACY-1215) sur les cellules primaires érythroïdes in vitro.	125
Figure 31. Étude transcriptionnelle dans les cellules érythroïdes primaires.	127
Figure 32. Modulation transcriptomique globale induite par l'inhibition d'HDAC6 dans les cellules primaires.....	129
Figure 33. Conséquences du knockdown d'HDAC6 médié par un shRNA dans la lignée cellulaire érythroleucémique UT7/EPO.	130
Figure 34. Le knockdown et l'inhibition chimique d'HDAC6 dans les cellules UT7/EPO et les cellules primaires entraînent une diminution de la phosphorylation de JAK2 et de STAT5 en réponse à l'EPO	133
Figure 35. Profil acétylomique des érythroblastes humains après inhibition d'HDAC6.	135
Figure 36. L'inhibition d'HDAC6 dans les cellules primaires entraîne une hyperacétylation de la 14-3-3 ζ , une diminution de la LNK/14-3-3 ζ et une augmentation de l'interaction JAK2/LNK.	137
Figure 37. Schéma représentant l'effet de l'ACY-1215 sur la signalisation de JAK2 en aval de l'activation de l'EPOR.....	147

Table des tableaux

Tableau I. Classification des enzymes de la famille des HDAC	19
Tableau II. Substrats d'HDAC6 et fonctions associées.....	32
Tableau III. Substrats de la voie PI3K/AKT, sites de phosphorylations et fonctions associées.	89
Tableau IV. Effets indésirables associés au ricolinostat survenus chez plus d'un patient.	112
Tableau V. Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour les expériences de WB ou de coIP et des anticorps utilisés en contrôle d'isotype.	115
Tableau VI. Liste des amorces pour la RQ-PCR.....	118

Liste des abréviations et acronymes

3'UTR : *Three prime Untranslated Transcribed Region*

ABCB7 : *ATP Binding Cassette Subfamily B Member 7*

ABCE1 : *ATP-binding cassette sub-family E member 1*

ALA : *Acide δ -aminolévulinique*

ALAS2 : *Acide δ -aminolévulinique synthase 2*

AQP1 : *Aquaporine 1*

ATAT1 : *Alpha-tubulin N-acetyltransferase 1*

ATF4 : *Activating transcription factor 4*

BACH1 : *BTB Domain And CNC Homolog 1*

BAD : *BCL2 Associated Agonist Of Cell Death*

BAG1 : *BAG Cochaperone 1*

BAX : *Bcl-2-associated X*

BCL2 : *B-cell lymphoma 2*

Bcl-xL : *B-cell lymphoma-extra large*

BCR-ABL : *Breakpoint cluster region gene - Abelson proto-oncogene*

BET : *Bromodomain and Extra-Terminal*

BFU-E : *Burst forming unit- erythroid*

bHLH : *Basic helix-loop-helix*

BRD3 : *Bromodomain-containing protein 3*

BUZ : *Binding-of-ubiquitin zinc*

C/EBPs : *CCAAT-enhancer-binding proteins*

CAI : *Codon Adaptation Index*

CAR : *Contractile actin ring*

CCH : *Concentration cellulaire en hémoglobine*

CD1 : *Catalytic domain 1*

CD2 : *Catalytic domain 2*

CD34 *Cluster of differentiation 34*

CDC42 : *Cell division control protein 42 homolog*

CDS : *CoDing Sequence*

CEN : *Core erythroid transcriptional network*

c-FLIP : *Cellular FLICE-like inhibitory protein*

CFU-E : *Colony forming unit - erythroid*

CFU-GEMM : *Colony forming unit – granulocyte, erythrocyte, monocyte, megakaryocyte*

ChIP : *Chromatin ImmunoPrecipitation*

CHK2 : *Checkpoint kinase 2*
CIS3 : *Cytokine-inducible SH2 protein-3*
CISH/SOCS : *Cytokine inducible SH2-containing protein/Suppressor of cytokine signalling*
CLINT1 : *Clathrin interactor 1*
CLRM : *Chaîne légère régulatrice de la myosine*
CMP : *Common myeloid progenitor*
CMV : *Corps multivésiculaire*
CoREST : *Corepressor of RE1 silencing transcription factor*
CP : *Ceruloplasmin*
CPB : *CREB-binding protein*
CPEB4 : *Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein 4*
CPgenIII : *Coproporphyrinogène III*
CREB : *C-AMP Response Element-binding protein*
CSDE1 : *Cold shock domain-containing protein E1*
CSPH : *Cellules souches/progénitrices hématopoïétiques*
CTTN : *Cortactine*
CXCR4 : *Chemokine C-X-C receptor-4*
CYBDR1 : *Cytochrome b réductase 1*
DAG : *Diacylglycerol*
DBA : *Diamond-Blackfan anemia*
DCYTB : *Duodenal cytochrome b*
DDX3X : *DEAD-box helicase 3 X-linked*
DEG : *Differentially Expressed Genes*
DMB : *Dynein motor binding*
DMT1 : *Divalent metal transporter 1*
DNase II-alpha : *Désoxyribonucléase 2-alpha*
DOT1L : *Disruptor of telomere silencing 1-like*
eIF2 α : *Eukaryotic translation initiation factor 2 α*
eIF3 : *Eukaryotic initiation factor 3*
eIF4G : *Eukaryotic translation initiation factor 4 G*
EKLF : *Erythroid Krüppel-like factor*
ELP3 : *Elongator Acetyltransferase Complex Subunit 3*
EMP : *Erythroblast macrophage protein*
EPO : *Erythropoietin*
EPOR : *Erythropoietin receptor*
ERFE : *Erythroferrone*
ERK : *Extracellular signal-regulated kinases, : Extracellular signal-regulated kinase*

ESCRT : *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*
FECH : *Ferrochelatase*
FLT3 : *Fms-like tyrosine kinase 3*
FLVCR1 : *Feline leukemia virus subgroup C receptor-related protein 1*
FOG1 : *Friend of GATA1*
FOXO : *Forkhead box O3*
FOXO1 : *Forkhead box O1*
FOXO3 : *Forkhead box O3*
FPN : *Ferroportin*
GAB : *Growth factor-bound protein (Grb)-associated binder*
GATA1 : *Gata binding protein 1*
GATA2 : *GATA-binding protein 2*
GCN5 : *General Control Non-repressed 5 protein*
GDF15 : *Growth/differentiation factor 15*
Gfi-1 : *Growth factor independent 1 transcriptional repressor*
GLRX5 : *Glutaredoxin 5*
GMP : *Granulocyte/monocyte progenitor*
GPA : *Glycophorine A*
GPX4 : *Glutathione peroxidase 4*
GRB2 : *Growth factor receptor-bound protein 2*
HAT : *Histone acetyltransferase*
HB : *Hémoglobine*
HBA : *Hemoglobin subunit alpha*
HBB : *Hemoglobin subunit beta*
HBF : *Hémoglobine F*
HBS1L : *HBS1 Like Translational GTPase*
HCP1 : *Heme Carrier Protein 1*
HDAC : *Histone deacetylase*
HDACi : *HDAC inhibitor*
HDLP : *Histone deacetylase-like protein*
HDM2 : *Human double minute 2*
HIF2 α : *Hypoxia inducible 2 α*
HMOX1 : *heme oxygenase 1*
HRG1 : *Heme-responsive gene 1 protein homolog*
HRI : *Heme-regulated inhibitor*
HSE : *Heat shock element*
HSF1 : *Heat Shock factor 1*

HSP : *Heat shock protein*
HSP70 : *70 kilodalton heat shock proteins*
HSP90 *Heat shock protein 90*
HSPA5 : *Heat shock protein family A (Hsp70) member 5*
HSPC : *Hematopoietic stem and progenitor cell*
huy : *human gamma globin*
ICAM-4 : *Intercellular Adhesion Molecule 4*
IEB : *îlot érythroblastique*
IGF1 : *Insulin-like growth factor 1*
IKB : *Inhibiteur de kappa B*
IL11 : *Interleukin 11*
IL3 : *Interleukin 3*
IP3 : *Inositol trisphosphate*
IRE : *Iron-response element*
IRP : *Iron regulatory protein*
IRP2 : *Iron regulatory protein 2*
IRS2 : *Insulin receptor substrate 2*
ISR : *Integrated stress response*
IVS2 : *Intervening sequence 2*
JAK2 : *Janus kinase 2*
KCC : *Potassium-chloride cotransporter*
KEAP1 : *Kelch Like ECH Associated Protein 1*
KIR : *Kinase inhibitory region*
KLF1 : *Krüppel-like factor 1*
LDB1 : *LIM domain binding proteins 1*
LMO2 : *LIM domain only 2*
LSD1 : *Lysine-specific histone demethylase 1*
LYN : *Lck/Yes novel tyrosine kinase*
MAP : *Microtubule associated protein*
MAPK : *Mitogen-activated protein kinases, : Mitogen-activated protein kinases*
MARE : *Maf recognition element*
MCIEB : *Macrophage central des îlots érythroblastiques*
MCL-1 : *Induced myeloid leukemia cell differentiation protein*
MDM2 : *Murine double minute 2*
MeCP2 : *Methyl CpG binding protein 2*
MEF2 : *Myocyte enhancer factor 2*
MEL : *Murine erythroleukemia*

MEP : *Megakaryocyte–erythroid progenitor*
MERTK : *Myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase*
Mn²⁺ : *Manganese (2+)*
mTORC1 : *Mechanistic target of rapamycin*
MX1 : *MX Dynamin Like GTPase 1*
NAD⁺ : *Nicotinamide adénine dinucléotide*
NCOR1 : *Nuclear receptor co-repressor 1*
NCOR2 : *Nuclear receptor co-repressor 2*
NES1 : *Nuclear export signal 1*
NES2 : *Nuclear export signal 2*
NF-E4 : *Nuclear Factor - Erythroid 4*
NFR1 : *Nuclear respiratory factor 1*
NF-κB : *Nuclear factor-kappa B*
NGS : *Next-generation sequencing*
NHEJ : *Non-Homologous End-Joining*
NLS : *Nuclear localization sequence*
NMP : *Néoplasies myéloprolifératives*
NRF2 : *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
NuRD : *Nucleosome remodeling and deacetylase*
NuRSERY : *Nuclear remodeling shuttle erythroid*
PARP : *poly(ADP-ribose) polymerase*
PELO : *Protein pelota homolog*
PI3K/AKT : *phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B*
PIEZO1 : *Piezo type mechanosensitive ion channel component 1*
PIP2 : *Pphosphatidylinositol bisphosphate*
PKC : *Protein kinase C*
PLC : *Phospholipase C*
PPARγ : *Peroxisome proliferator- activated receptor gamma*
PPIX : *Protoporphyrine IX*
PV : *Polyglobulie vera ou polyglobulie primitive de Vaquez*
RAF *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*
RAS *Rat sarcoma virus*
RBM38 : *RNA Binding Motif Protein 38*
RBP : *RNA Binding Proteins*
REST : *Repressor element-1 silencing transcription factor*
RIOK3 : *RIO Kinase 3*
RLP11 : *Receptor like protein 11*

RP : *Ribosomal protein*
SCF : *Stem cell factor*
SCFAD : *Short-chain fatty acids*
SCL/TAL1 : *Stem cell leukemia/T-cell acute leukemia 1*
SDF-1 : *Stromal cell-derived factor-1*
SE14 : *Serine-glutamate tetradecapeptide repeat*
SETD8 : *SET domain-containing protein 8*
SH2 : *Src homology region 2*
SH2B3/LNK : *Src homology 2 B adaptor protein 3/ Lymphocyte specific adapter protein*
SHC : *SRC homology and Collagen*
SHIP1 : *SH2 domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase 1*
shRNA : *short hairspin RNA*
SIN3A : *Switch-independent 3 family member A*
siRNA : *Small interfering RNA*
SIRT : *Sirtuine*
SLC40A1 : *Solute Carrier family 40 member 1*
SLC46A1 : *Solute Carrier Family 46 Member 1*
sMaf : *Small Maf (musculoaponeurotic fibrosarcoma)*
SMD : *Syndrome myélodysplasique*
SMRT/N-CoR : *silencing mediator of retinoicacid and thyroid hormone receptor/nuclear receptor corepressor*
SOS : *Son of sevenless*
SPIC : *Spi-C Transcription Factor*
SQSTM1 : *Sequestosome*
SSI3 : *STAT-induced STAT inhibitor 3*
STAT : *Signal transducer and activator of transcription*
STAT5 : *Signal transducer and activator of transcription 5*
TAF9 : *TATA-binding protein-associated factor 9*
TFIID : *Transcription factor IID*
TIM4 : *T-cell membrane protein 4*
TIP60 : *Tat-interactive protein 60*
TPO : *Thrombopoietin*
TSA : *Trichostatine A*
UPRmt : *Mitochondrial unfolded protein response*
UPS : *Ubiquitin proteasom system*
VCAM-1 : *Vascular cell adhesion molecule 1*
VCP : *Valosin containing protein*

VEGFB : *Vascular endothelial growth factor B*

VLA4 : *Very late antigen-4*

WDR26 : *WD repeat-containing protein 26*

XLSA/A : *X-linked sideroblastic anemia and ataxia*

XPO7 : *Exportin 7*

Zn²⁺ : *Zinc (2+)*

βLCR : *β locus control region*

γH2AX : *Phosphorylated histone H2AX*

INTRODUCTION

I. Les histones désacétylases (HDAC)

I.1. Les HDAC : découverte et classification

I.1.1. Découverte des HDAC

Dans les années 1960, l'hypothèse que des modifications post-traductionnelles réversibles des histones telle que l'acétylation permettaient de réguler l'activité transcriptionnelle a été proposée^{1,2}. Par la suite, les HAT et les HDAC ont été identifiées. Ces enzymes sont capables de modifier de manière covalente les groupements amino- ϵ de la chaîne latérale des résidus lysine des histones de coeur, ce qui impacte la régulation de l'expression génique, mais aussi d'autres protéines non-histones³⁻⁷.

Les HDAC ont été numérotées en fonction de l'ordre chronologique de leur découverte. Ainsi, HDAC1, la première histone désacétylase humaine identifiée, a été purifiée par Taunton et al. en 1996 à partir d'un extrait protéique bovin en utilisant la chromatographie d'affinité avec une colonne couplée à la trapoxine, un inhibiteur d'HDAC⁸. HDAC2 a ensuite été caractérisée au cours de la même année^{9,10}, suivie d'HDAC3 l'année suivante^{11,12}. HDAC4, HDAC5, et HDAC6 ont été décrites pour la première fois en 1999¹³, puis HDAC7 et HDAC8 au cours de l'année 2000^{14,15}. Enfin, les autres HDAC ont été découvertes entre 2000 et 2002¹⁶⁻¹⁸.

I.1.2. Classification des HDAC

Les HDAC diffèrent en fonction de leur structure, de leur spécificité de substrat, de leur mécanisme enzymatique, de la localisation intracellulaire et de l'expression tissu-spécifique. Chez l'homme, on dénombre 18 HDAC qui jouent des rôles divers dans l'homéostasie cellulaire et dans la croissance des tumeurs.

Elles peuvent tout d'abord être divisées en deux grands groupes fonctionnels selon la nature du cofacteur enzymatique auquel elles sont associées (Tableau I). On distingue ainsi les HDAC dépendantes du zinc des HDAC dépendantes du NAD⁺^{10,19}.

Les HDAC dépendantes du zinc sont caractérisées par un pli arginase. Elles présentent en effet une organisation structurale au niveau du site catalytique similaire à celle de l'arginase c'est-à-dire un pli α/β qui consiste en un feuillet central à 8 brins parallèles β , pris en sandwich entre

plusieurs hélices α . Le pli arginase a été fortement conservé chez les HDAC malgré une divergence évolutive significative, ces enzymes partageant moins de 15% d'identité de séquence d'acides aminés avec l'enzyme arginase. De plus, le pli arginase comporte un motif en forme de boucle qui intervient dans la liaison à l'ion métallique. Ainsi, l'arginase se lie à deux ions Mn^{2+} , tandis que les enzymes HDAC se lient à un seul ion métallique de transition Zn^{2+} en raison d'une importante divergence dans la séquence des acides aminés² (Figure 1).

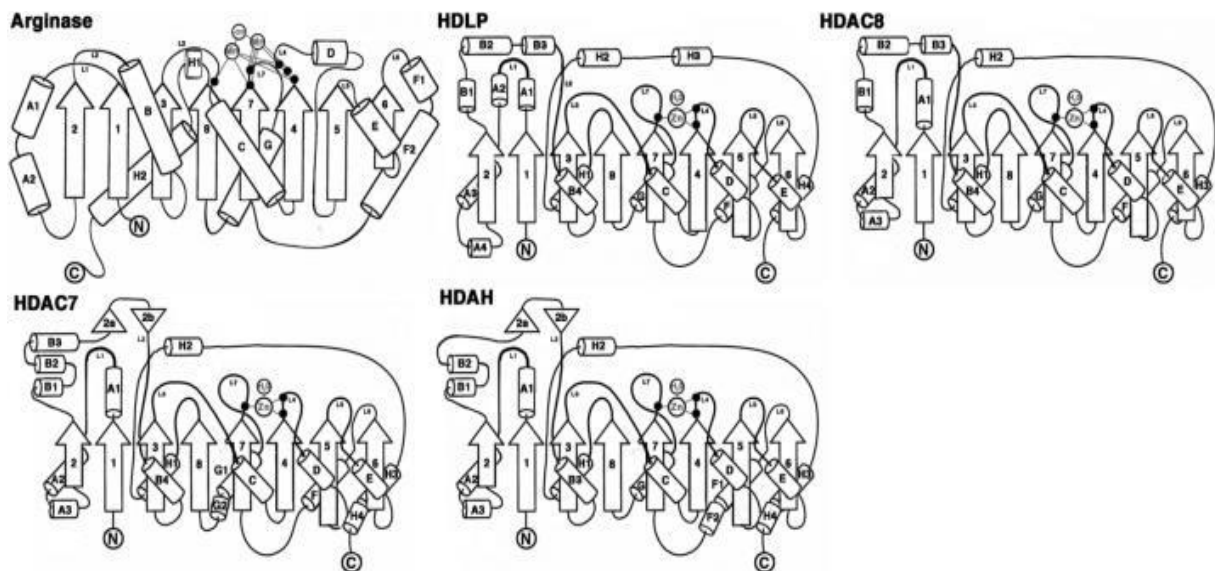


Figure 1. Représentations des structures secondaires de l'arginase et de différentes enzymes de la famille des HDAC (HDLP, HDAC8, HDAC7 et HDAH). (d'après Dowling et al. 2008²).

Les positions des ions métalliques, reliés aux extrémités C-terminales des brins β 4 et 7 sont indiquées. Cylindres = hélices a ; flèches = feuilletts b.

Les HDAC dont l'activité enzymatique dépend du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) présente un pli Rossmann typique. Il s'agit d'un motif structural fréquemment retrouvé dans les protéines qui sont capables de se lier aux nucléotides et notamment le NAD^+ ²⁰.

Par ailleurs, les HDAC peuvent être catégorisées en quatre classes en fonction de leur homologie de séquence et de structure tertiaire avec les HDAC de levure (Tableau I). La classe I comprend les HDAC1, HDAC2, HDAC3 et HDAC8. Les enzymes de cette classe sont des homologues de la désacétylase de levure RPD3^{9,12,21-23} (>43% d'identité entre les séquences des HDAC de classe I et celle de RPD3 et > 65% de similarité²⁴). Ils sont ubiquitaires et localisés principalement dans le noyau. Il est à noter toutefois qu'HDAC3 a pour particularité d'être retrouvée à la fois dans le noyau et le cytoplasme, le rapport de répartition noyau/cytoplasme variant en fonction des types cellulaires^{25,26}.

La classe II est représentée par HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7 et HDAC10. Elles sont apparentées à la protéine HDA1 de levure^{13-16,27} (>34% d'identité entre les séquences des

HDAC de classe II et celle de HDA1 et > 51% de similarité²⁴). Cette classe semble jouer des rôles spécifiques aux tissus en fonction du statut de phosphorylation. Elle se divise elle-même en deux sous-groupes : la classe IIa qui regroupe HDAC4, HDAC5 et HDAC7 et la classe IIb, qui comprend HDAC6 et HDAC10. Ces enzymes sont capables de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau^{25,28-31}. HDAC6 est la principale désacétylase cytoplasmique des cellules de mammifères^{25,32}. HDAC6 se distingue de toutes les autres HDAC en ce qu'elle contient deux domaines désacétylase et un motif en doigt de zinc C-terminal.

La classe III regroupe les sirtuines 1-7 dont l'activité catalytique dépend de la coenzyme NAD⁺, qu'elles sont capables de fixer, à la différence des autres HDAC, grâce à la présence d'un pli Rossman^{6,33}. Le nom de ces histone désacétylases provient de Sir2p, premier membre de cette famille de molécules identifié chez la levure bourgeonnante³⁴. Elles se localisent dans des compartiments cellulaires variés tels que le noyau, le cytoplasme ou les mitochondries³⁵.

La classe IV est représentée par un membre unique : HDAC 11. Les degrés d'identité/similarité sont de 24%/42% entre HDAC11 et HDA1 et de 31%/41% entre HDAC11 et RPD3²⁴. Les analyses de séquence de la protéine HDAC11 indiquent qu'elle contient des résidus conservés dans des régions du site catalytique communes aux HDAC de mammifères de classe I et II¹⁸. Elle est à la fois retrouvée dans le noyau et le cytoplasme³⁶⁻³⁸.

Classe	Protéine humaine	Localisation cellulaire	Cofacteur
Classe I	HDAC1	Noyau	Zn ²⁺ dépendant
	HDAC2	Noyau	
	HDAC3	Noyau/Cytoplasme	
	HDAC8	Noyau	
Classe IIa	HDAC4	Noyau/Cytoplasme	Zn ²⁺ dépendant
	HDAC5	Noyau/Cytoplasme	
	HDAC7	Noyau/Cytoplasme	
	HDAC9	Noyau/Cytoplasme	
Classe IIb	HDAC6	Noyau/Cytoplasme	Zn ²⁺ dépendant
	HDAC10	Noyau/Cytoplasme	
Classe III	SIRT1	Noyau	NAD ⁺ dépendant
	SIRT2	Cytoplasme	
	SIRT3	Mitochondrie	
	SIRT4	Mitochondrie	
	SIRT5	Mitochondrie	
	SIRT6	Noyau	
	SIRT7	Noyau	
Classe IV	HDAC11	Noyau/Cytoplasme	Zn ²⁺ dépendant

Tableau I. Classification des enzymes de la famille des HDAC (adapté à partir de Zhang et al., 2017³⁹)

Les enzymes des classes I, II et IV définissent la famille classique des HDAC. Ce sont des amidohydrolases zinc-dépendant, sensibles aux composés chélateurs de Zn²⁺ comme les dérivés d'acides hydroxamiques. En revanche, les sirtuines, HDAC de classe III, étant des enzymes NAD⁺-dépendants, sont insensibles aux inhibiteurs dérivés d'acides hydroxamiques^{40,41}.

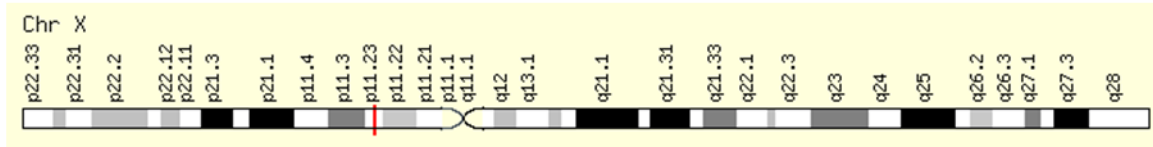
1.2. HDAC6, généralités et structure protéique

1.2.1. Généralités

Membre de la classe IIb des HDAC, la protéine HDAC6 a été découverte par Verdel et Khochbin en 1999 chez la souris et portait alors le nom de mHDA2. Le gène codant HDAC6 est situé sur la région chromosomique Xp11.23 et a une taille de plus de 22000 pb (Figure 2A)⁴². Avec ses 1215 acides aminés, HDAC6 est actuellement considérée comme la plus grande des protéines HDAC connues¹³ (Figure 2B, Annexe 1). En comparaison avec les autres

enzymes de la famille humaine des HDAC, elle se démarque par une homologie de séquence plus élevée avec HDA1, histone désacétylase de levure⁴³.

A.



B.

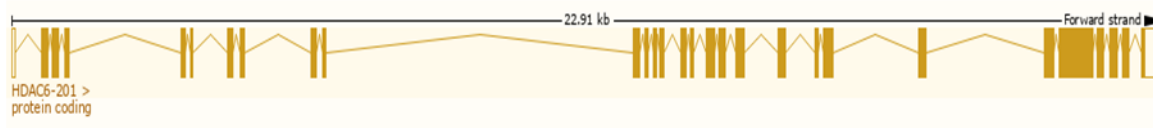


Figure 2. HDAC6, localisation du gène *hdac6* et ARN transcrit.

A. Localisation du gène HDAC6 sur la région chromosomique Xp11.23 (d'après www.genecards.org).
 B. Exemple de transcrit codant du gène HDAC6 d'origine humaine (identifié ENST00000334136.11 d'après la base de données génomiques www.ensembl.org). Les exons codants au nombre de 28 sont représentés par des barres pleines, tandis que les introns sont représentés par des lignes reliant les exons. La longueur du transcrit est de 4118 pb et la séquence traduite est constituée de 1215 résidus d'acides aminés.

1.2.2. Structure protéique d'HDAC6

La poche du domaine catalytique des HDAC de la famille classique des HDAC (I, II, IV) correspond à une structure cylindrique étroite et contient un ion Zn^{2+} situé près de sa base^{41,44,45}. Membre de la classe IIb, HDAC6, de son extrémité N-terminale vers la partie C-terminale, se caractérise par les domaines protéiques spécifiques suivants : un signal de localisation nucléaire riche en résidus arginine et lysine (NLS), une séquence d'export nucléaire riche en leucine (NES1), les sites catalytiques CD1 et CD2 séparés par le domaine de liaison à la dynéine (DMB), la séquence de rétention cytoplasmique SE14, une deuxième séquence d'export nucléaire (NES2) et le domaine de liaison à l'ubiquitine en doigt de zinc (BUZ) (Figure 3).

Les deux domaines catalytiques CD1 et CD2, tous deux fonctionnels, représentent une particularité unique à HDAC6 au sein des enzymes de la famille des HDAC. Il a été suggéré que ces deux domaines catalytiques dérivent de la duplication à partir d'un même gène en raison de leur degré élevé d'homologie^{13,46}.

L'extrémité C-terminale d'HDAC6 contient un domaine en doigt de zinc capable de se lier à

l'ubiquitine (domaine ZnF-UBP, également connu sous les noms PAZ, BUZ ou DAUP)⁴⁷. Ce domaine se fixe préférentiellement aux formes poly-ubiquitinylées des protéines au niveau du résidu lysine K63 et est impliqué dans la régulation de la dégradation médiée par l'ubiquitinylation^{48,49}.

Une petite séquence appelée DMB (*dynein motor binding*) d'environ 65 acides aminés, située entre CD1 et CD2, intervient dans l'interaction avec la dynéine, complexe protéique moteur associé aux microtubules qui assure le transport des protéines polyubiquitinylées mal repliées vers les agrésomes⁵⁰.

HDAC6 possède plusieurs séquences impliquées dans sa localisation cytoplasmique. Il s'agit des domaines NES, séquences d'exportation nucléaire, motifs de petite taille riches en résidus leucine et de SE14, séquence de rétention cytoplasmique, qui stabilise l'ancrage d'HDAC6 dans le cytoplasme⁵¹. SE14 est un domaine hautement conservé chez l'homme, qui se caractérise par huit répétitions d'un tétradécapeptide riche en motifs Ser-Glu⁵².

Des études ultérieures ont montré qu'HDAC6 est également localisée dans le noyau^{31,53,54}. Ceci est possible grâce à la présence au sein d'HDAC6, de la séquence de localisation nucléaire (NLS), qui est capable d'interagir avec l'importine α et de permettre ainsi la translocation d'HDAC6 vers le noyau. La navette entre le cytoplasme et le noyau, ainsi que l'activité d'HDAC6 pourraient être modulées par des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation^{31,55}. Ainsi, une forte acétylation de NLS entraîne l'inhibition de l'interaction avec l'importine α et donc la diminution de la quantité d'HDAC6 dans le noyau. Cette réduction d'HDAC6 nucléaire induite par une hyperacétylation de NLS pourrait avoir un impact sur la désacétylation des histones et l'expression des gènes³¹.

Malgré la présence de la séquence de localisation nucléaire (NLS), HDAC6 reste majoritairement localisée dans le compartiment cytoplasmique grâce à l'action des motifs NES et SE14, et y exerce ses fonctions biologiques principales^{51,56}.

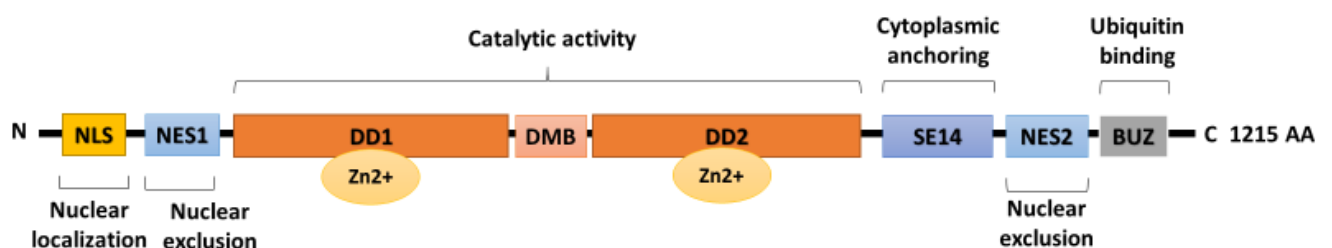


Figure 3. Représentation schématique des domaines fonctionnels d'HDAC6.

NLS : nuclear localization signal ; NES : nuclear export signal ; CD1 : catalytic domain 1 ; DMB : dynein motor binding ; CD2 : catalytic domain 2 ; SE14 : serine-glutamate tetradecapeptide repeat ; BUZ : zinc-finger ubiquitin binding domain (Figure adaptée à partir de Li et al. 2013⁵⁷).

I.3. Mécanismes d'action catalytique des HDAC

La première protéine de la famille classique des HDAC dont la structure tridimensionnelle a été résolue par cristallographie aux rayons X est l'HDLP (*histone deacetylase-like protein*) extraite à partir de la bactérie hyperthermophile *Aquifex aeolicus*. HDLP a la même structure tertiaire que l'arginase en ce qu'elle possède un pli α/β constitué d'un feuillet central à 8 brins parallèles β , pris en sandwich entre plusieurs hélices α ²³ (Figure 4). Cette similarité structurale avec l'arginase, une métalloenzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'arginine en ornithine, suggère que l'HDLP a évolué à partir d'un ancêtre commun des métalloprotéines.

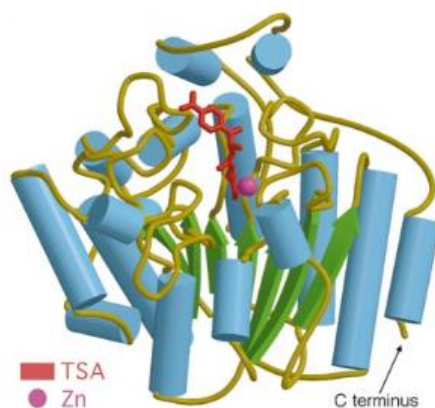


Figure 4. Complexe HDLP- Zn²⁺-TSA.

Figure réalisée à partir des programmes MOLSCRIPT et RASTER3D (d'après Finnin et al., 1999²³).

I.3.1. Classe I

Des études de cristallographie par rayons X ont montré que les HDAC de mammifères ont un domaine catalytique structurellement similaire à celui de l'HDLP, domaine dans lequel les résidus constituant le site actif sont conservés au sein de la famille des HDAC. À partir de ces études, un premier mécanisme catalytique de désacétylation a été proposé pour les HDAC dépendants d'un ion métallique. Dans ce modèle commun aux enzymes de la famille classique des HDAC (

Figure 5), l'hydrolyse de la liaison acétamide situé sur le résidu lysine acétylé du substrat est possible grâce à la présence au sein de la poche catalytique de résidus histidine qui fonctionnent en tandem (His-131 et His-132) en tant que catalyseurs base générale – acide général^{10,23}. Le noyau imidazole de l'histidine contient un atome d'azote pouvant capter un proton avec un pKa proche de la neutralité (pKa 6,8) et donc des conditions physiologiques. Une variabilité rapide de charge due à la valeur du pKa du groupement imidazole de l'histidine entre pH 6,5 et pH 7,5 explique la facilité avec laquelle l'histidine cède ou accepte des protons et sa participation moléculaire fréquente aux mécanismes de catalyse enzymatique.

Les enzymes de la classe I présentent un site de liaison au zinc constitué de la triade de résidus Asp/Asp/His et d'un site catalytique composé de deux histidines, d'un résidu tyrosine et d'une molécule d'eau nucléophile¹⁰. Un ion potassium situé à environ 7 Å du zinc catalytique pourrait également jouer un rôle dans la liaison au substrat^{20,58}.

Au cours de la désacétylation, il a été ainsi suggéré d'après ce modèle qu'un premier résidu histidine (H131) jouerait le rôle de catalyseur base général capable de déprotoner une molécule d'eau liée à l'ion métallique. Cette molécule d'eau ainsi activée réaliserait une attaque nucléophile sur le carbone de la liaison carbonyle (C = O) de l'acétyl-lysine, ce qui permet de former une structure intermédiaire tétraédrique. Cette dernière est stabilisée par l'ion divalent Zn²⁺ et un résidu tyrosine (H297) situés à l'opposé de la triade Asp/Asp/His. Par la suite, le deuxième résidu histidine (H132) agirait comme un acide général qui protone le groupement amine partant de la lysine, ce qui facilite la rupture du complexe et entraîne la libération des produits acétate et lysine.

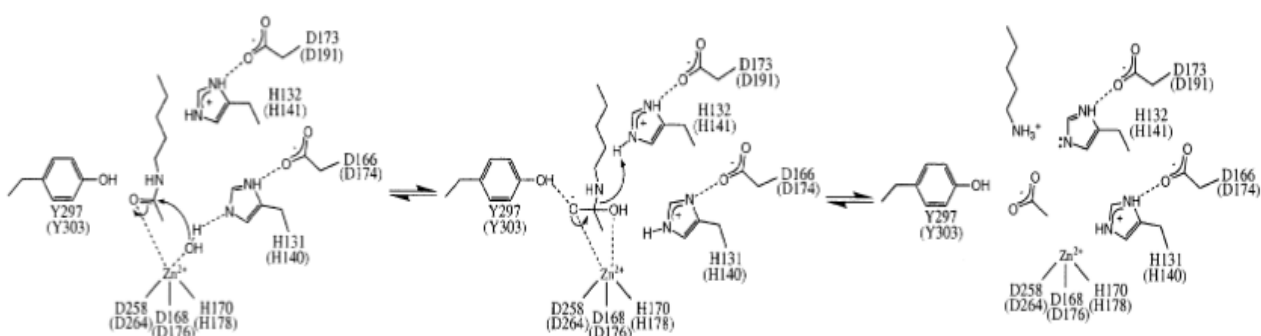


Figure 5. Modèle de mécanisme de désacétylation catalysée par les HDAC dépendants du Zn²⁺ proposé à partir de l'étude de la protéine HDLP (d'après Finnin et al. 1999²³).

Cependant, des analyses structurales, biochimiques et mutationnelles plus récentes portant sur HDAC8, enzyme de classe I, ont conduit à envisager un autre modèle mécanistique décrivant

la désacétylation du résidu lysine porté par le substrat (Figure 6). Dans ce nouveau modèle, un seul résidu histidine (H143) situé au sein de la poche catalytique joue à la fois les rôles de base générale et d'acide général. Le deuxième résidu histidine du tandem (H142) reste protoné tout au long du cycle catalytique et n'intervient qu'en tant que catalyseur électrostatique aidant à positionner le premier résidu (H143) de façon adaptée à la réaction enzymatique. L'ion métallique Zn^{2+} et le résidu tyrosine (Y306) orientent le substrat carbonyle et stabilisent la structure intermédiaire tétrahédrique, favorisant l'attaque nucléophile par la molécule d'eau⁵⁹⁻⁶¹.

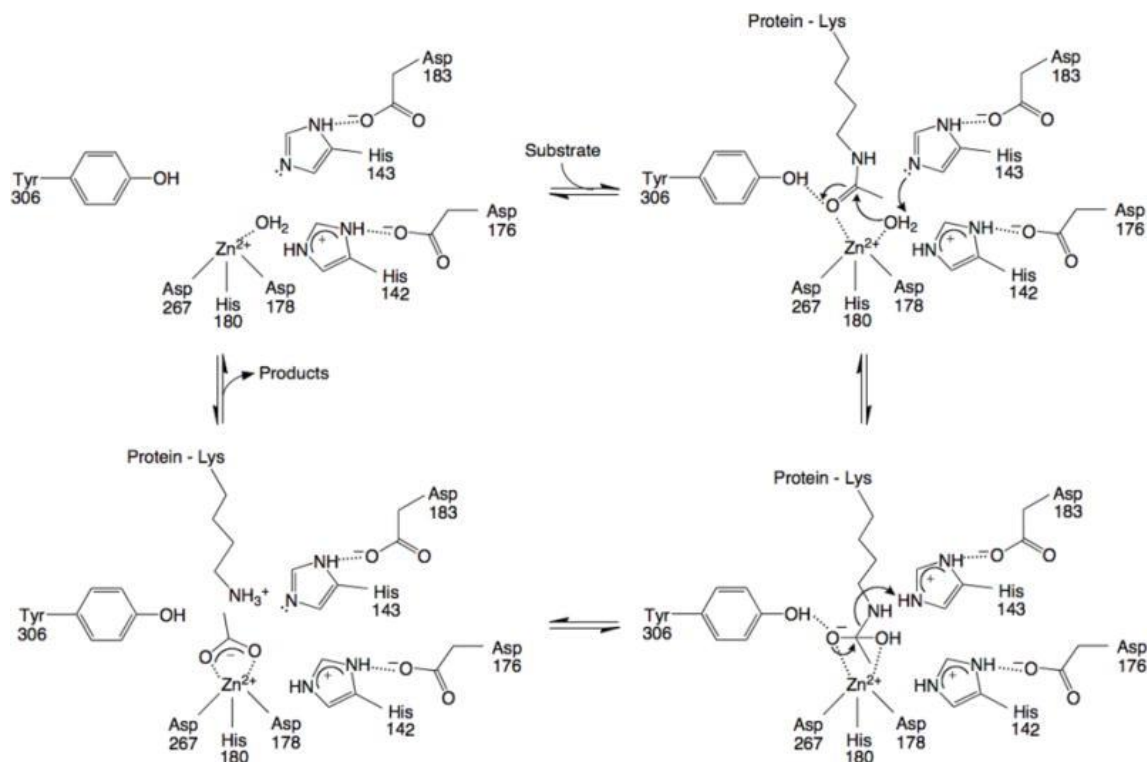


Figure 6. Modèle de mécanisme de désacétylation par les HDAC dépendants du Zn^{2+} modifié et proposé à partir de l'étude d'HDAC8 (d'après Gantt et al. 2016⁵⁹).

1.3.2. Classe IIa

Les HDAC de classe IIa sont des désacétylases à activité catalytique faible. Cela est dû à la substitution du résidu tyrosine, qui intervient dans la stabilisation de la structure intermédiaire tétrahédrique, par une histidine. De plus, les histones ne sont pas leurs substrats. Il est actuellement considéré que l'activité catalytique associée aux HDAC de classe IIa repose sur leur interaction avec HDAC3, HDAC de classe I, et le corépresseur transcriptionnel SMRT/N-CoR (*silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor/nuclear receptor corepressor*) au sein d'un même complexe, dans lequel seule la protéine HDAC3 associée joue

un rôle catalytique significatif^{20,62}.

1.3.3. Classe IIb et cas particulier d'HDAC6

Les membres de la classe IIb ressemblent fortement aux enzymes de la classe I, bien qu'elles se caractérisent par de légères différences de fonctionnement sur le plan catalytique. HDAC6, désacétylase de la classe IIb, a pour particularité unique de posséder un dimère constitué de deux sites catalytiques fonctionnels : CD1 et CD2. La question de la fonctionnalité de ces deux sites a été longtemps discutée. Les premières études biochimiques indiquaient qu'elles possédaient toutes deux une activité désacétylase sur les histones de cœur *in vitro*, mais que seul CD2 était capable de désacétyler la tubuline, ce qui suggère qu'il existerait une spécificité de substrats variables entre ces deux sites¹³. Puis d'autres études ont suggéré que seul le site CD2 était catalytiquement actif bien que la présence simultanée des deux domaines soient nécessaires à l'activité désacétylase globale de l'enzyme^{63,64}. Plus récemment, des études ont montré que le site CD1 possède bien plusieurs activités catalytiques distinctes : il agit notamment en tant qu'E3 ubiquitine ligase⁶⁵ et en tant que désacétylase de DDX3X (*DEAD-box helicase 3 X-linked*), une hélicase à ARN⁶⁶.

1.3.3.1. Le site catalytique CD1 d'HDAC6

Parmi les deux domaines catalytiques d'HDAC6, CD1 est celui qui a été le moins bien décrit. Récemment, des études par cristallographie aux rayons X portant sur les complexes d'inhibition avec le site catalytique CD1 ont permis de révéler davantage d'informations sur la structure de CD1, son fonctionnement et ses affinités d'interaction avec les inhibiteurs des HDAC⁶⁷. Entre CD1 et CD2, le site de liaison Zn^{2+} et les résidus catalytiques restent identiques, ce qui suggère que le mécanisme chimique de l'hydrolyse des liaisons amides est identique dans les deux domaines catalytiques : l'ion Zn^{2+} et le résidu de tyrosine catalytique polarisent le groupe carbonyle scissile de l'acétyl-lysine ce qui favorise une attaque nucléophile par une molécule d'eau liée à l'ion Zn^{2+} , tandis que les résidus histidine fonctionnent en tandem en tant que base générale et acide général dans un système de relais de charge⁶⁸.

Les études de l'activité catalytique de CD1 montrent une spécificité de substrat plus étroite en comparaison avec CD2. CD1 possède notamment une activité catalytique maximale vis-à-vis des substrats peptidiques contenant des résidus acétyl-lysine C-terminal. Des modifications du groupement carboxylate de l'acétyl-lysine par amidification ou par formation de liaison peptidique avec un acide aminé perturbent l'activité catalytique de CD1, bien qu'une activité

faible soit encore observée lorsque de petits résidus sont ajoutés au substrat sur la liaison scissile carboxylée du résidu acétyl-lysine. Malgré une spécificité de substrat étroite, CD1 dispose d'une poche catalytique plus large que celle du domaine CD2. Cette différence structurale est notamment liée à la présence d'une cavité aromatique formée par les résidus F202 et W261 au niveau du site CD1 d'HDAC6, tandis que celle-ci est constituée par F583 et F643 dans le site CD2. Cela expliquerait en outre les différences d'orientation spatiale de la trichostatine A et d'autres inhibiteurs d'HDAC au sein de la poche catalytique⁶⁷.

1.3.3.2. Le site catalytique CD2 d'HDAC6

En comparaison avec le site CD1, CD2 a été plus largement étudié et a permis le développement de nombreux inhibiteurs sélectifs d'HDAC6 actuellement testés dans différents essais précliniques et cliniques^{69,70}. Au niveau de ce site actif, deux résidus histidine majeurs fonctionnent en tandem dans la catalyse de la désacétylation du résidu lysine, l'un jouant le rôle de base générale (H573) et l'autre d'acide général (H574). Plus précisément, H573 pourrait intervenir en tant que base catalytique générale avec l'ion Zn^{2+} dans l'activation d'une molécule d'eau nucléophile. Cette molécule d'eau activée effectue ensuite une attaque nucléophile au niveau de la liaison covalente scissile du groupement carbonyle de l'acétyl-lysine, ce qui forme une structure tétrahédrique intermédiaire, piégée au fond de la poche catalytique. La rupture de ce complexe n'est possible qu'en présence de l'histidine H574, qui par son rôle catalytique général est capable de protoner le groupement amino- sortant, libérant ainsi la lysine et l'acétate^{68,71,72} (Figure 7).

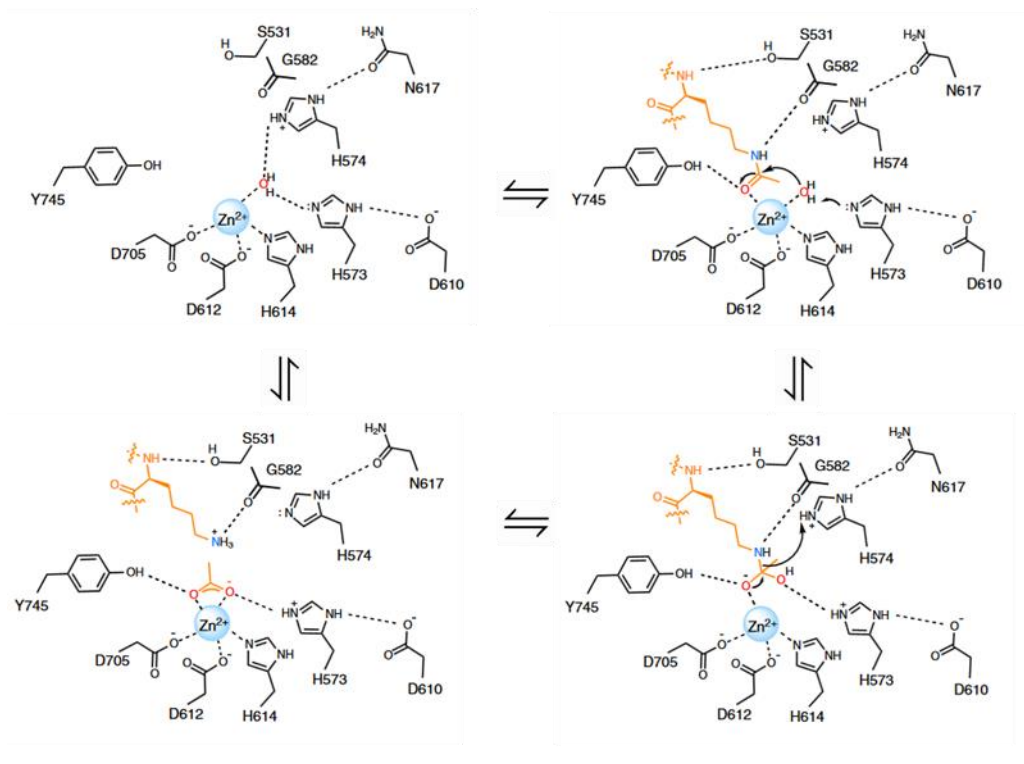


Figure 7. Modèle de catalyse enzymatique proposé pour la désacétylation du résidu lysine au niveau du domaine CD2 d'HDAC6 (Figure adaptée à partir de Christianson et al. 2016⁷¹).

CD2 est principalement responsable de la désacétylation des protéines non histones, telles que la tubuline α , HSP90, la cortactine ou la protéine tau^{70,73-76}. HDAC6 joue par conséquent un rôle important dans la régulation des activités chaperonnes ou la dynamique du réseau des microtubules associé au trafic intracellulaire ou à la mobilité cellulaire^{77,78}. Une hyperexpression d'HDAC6 est en outre associée au potentiel d'invasion des cellules de cancer métastatique⁷⁹.

1.3.4. Classe III

Les HDAC de classe III, également appelés sirtuines, ont un mécanisme dépendant du NAD⁺. Ce mécanisme se distingue fortement de l'activation de la molécule d'eau nucléophile dépendante du Zn²⁺ utilisée par les autres enzymes HDAC. Les sirtuines diffèrent notamment en ce qu'elles possèdent à la fois des activités désacétylase et d'ADP-ribosyl transférase. D'abord, le NAD⁺ permet de former un complexe ternaire avec l'enzyme et le substrat, puis le groupement acétyle est transféré vers l'ADP-ribose à partir du substrat, ce qui forme un O-acétyl-ADP-ribose et un produit dont le résidu lysine est désacétylé⁸⁰.

I.4. Rôle des HAT et des HDAC dans la régulation de l'expression génique

I.4.1. Acétylation/Désacétylation des histones

L'épigénétique est la discipline qui s'intéresse aux variations de l'expression génique, transmissibles au cours de la division cellulaire, et n'impliquant pas de modifications de la séquence d'ADN. Les changements épigénétiques sont réversibles à la différence des mutations qui affectent la séquence de l'ADN. Il s'agit concrètement de marques biochimiques induites par l'environnement, qui sont appliquées par des enzymes spécialisées sur l'ADN ou sur les histones, protéines qui s'associent à l'ADN pour le compacter et former la chromatine. Chez l'homme, les marques les plus décrites sont les groupements méthyles apposés sur les résidus de cytosine des dinucléotides C-G de l'ADN⁸¹, ainsi que diverses modifications chimiques des histones (méthylation, acétylation...)⁸². Depuis la découverte en 1964 par Allfrey et al. de la corrélation entre les niveaux d'acétylation des histones et l'activité transcriptionnelle des gènes¹, les histones de cœur sont devenues les protéines cibles les mieux caractérisées des processus d'acétylation et de désacétylation. Ces processus jouent un rôle important dans la régulation de la transcription dans les cellules eucaryotes⁸³⁻⁸⁵. Le statut d'acétylation des histones de cœur et des protéines non-histones est régulé par les activités antagonistes des HAT et des HDAC. Les HAT ajoutent un groupement acétylé sur les résidus lysine des queues amino-terminales des histones, tandis que les HDAC retirent le groupement acétylé⁸⁶. Les interactions électrostatiques entre le squelette phosphodiester chargé négativement de l'ADN et les résidus basiques chargés positivement des queues N-terminales des histones de cœur maintiennent la chromatine en une structure étroitement compacte. Cependant, la charge positive portée par le résidu lysine peut être neutralisée lorsqu'elle est acétylée et restaurée lorsqu'elle est désacétylée⁸⁷. Il a ainsi été montré que l'acétylation des histones par les HAT, en neutralisant la charge positive des résidus lysine situés sur les queues des histones, produit le relâchement de la chromatine, ce qui favorise l'accessibilité de l'ADN aux complexes transcriptionnels^{88,89}. À l'inverse, en désacétylant les histones, les HDAC rétablissent les charges positives et favorisent ainsi la compaction de la chromatine dans une conformation qui est répressive dans la plupart des processus cellulaires^{87,90}. Un enroulement plus serré de l'ADN est en effet associé à une diminution de l'accessibilité des facteurs de transcription à l'ADN, ce qui réduit l'expression génique⁹¹⁻⁹³.

Du reste, plusieurs études ont montré que les HAT agissent comme des co-activateurs transcriptionnels, notamment GCN5, PCAF, CBP, p300, Tip60 et MOF^{94,95}, tandis que d'autres

ont suggéré que les HDAC sont associées à la répression génique^{91,96-98} et sont remplacées, lors de la transduction de signal, par des HAT co-activateurs pour une activation ultérieure de la chromatine^{99,100}.

La relation qui unit les HDAC avec l'expression génique dans la levure reste pourtant sujette à controverses. Des travaux indiquent en effet que les HDAC sont hautement présentes au niveau des gènes actifs et peuvent donc également être impliquées dans la transcription active^{101,102}. Des recherches antérieures ont en outre montré que les complexes HDAC de levure RPD3 et RPD1 sont impliqués à la fois dans la répression et l'activation de la transcription^{103,104}. En faveur de l'hypothèse que les HDAC n'agissent pas seulement en tant que corépresseur génique, viennent en outre des études révélant que les HDACi sont capables de réprimer la transcription de nombreux gènes¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Les travaux de Wang et al. ont montré que les HAT et les HDAC peuvent en fait intervenir sur un mode collaboratif dans l'expression génique et l'acétylation des histones. Le lien fonctionnel qui s'établit entre les HAT (CBP, p300, PCAF, Tip60, MOF) et les HDAC (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6) a ainsi été étudié. Ces deux familles d'enzymes aux activités antagonistes peuvent être recrutées au niveau de la chromatine active pour favoriser, ensemble, l'expression génique et l'acétylation des histones¹⁰⁸. C'est d'abord une cartographie à l'échelle du génome des liaisons entre la chromatine et les enzymes HAT ou HDAC qui a permis de montrer que ces enzymes se localisent au niveau des régions des gènes transcriptionnellement actives avec des histones acétylées. Leur recrutement est communément assuré par l'ARN Pol II phosphorylé. L'équipe de Wang et al. suggère que les HDAC jouent deux rôles majeurs au niveau de la chromatine. La première fonction des HDAC correspond à la réinitialisation de la chromatine et se déroule au niveau des gènes activés. La majorité des HDAC du génome humain fonctionnent par la réinitialisation de la chromatine en supprimant l'acétylation produite par les HAT au niveau des gènes actifs. Cette étape est nécessaire pour initier le prochain cycle de transcription. La deuxième fonction des HDAC se situe au niveau des gènes inactivés : les gènes inactifs qui sont amorcés par la méthylation de l'histone H3K4 sont soumis à un cycle dynamique d'acétylation et de désacétylation par des liaisons transitoires HAT/HDAC. Le faible niveau d'acétylation résultant de ce processus dynamique empêche la fixation de Pol II, ce qui maintient les promoteurs des gènes dans un état inactif, mais les prépare à une activation future. Il est à noter qu'il n'existe pas de preuves en faveur de l'hypothèse que les HDAC sont capables de fixer des gènes réprimés ne présentant pas de signal de méthylation de l'histone H3K4¹⁰⁸.

Au niveau de la chromatine, l'équilibre entre l'acétylation et la désacétylation des protéines

histones et non-histones jouent donc un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes. Il est à noter que les HAT et les HDAC agissent principalement au sein de complexes protéiques contenant de nombreuses autres enzymes et leurs cofacteurs. Ces complexes comprennent notamment les protéines à bromodomains, décrites comme des « lecteurs » des résidus lysine acétylés situés sur les queues N-terminales des histones. En reconnaissant spécifiquement ces marques épigénétiques, les protéines à bromodomains permettent l'ancrage des complexes protéiques dont elles font partie, ce qui rend possible l'exercice d'une multitude de fonctions biologiques impliquées dans la régulation de l'expression génique telles que le recrutement de facteurs de transcription, l'acétylation des histones, ou le remodelage de la chromatine^{109,110}.

1.4.2. Acétylation/Désacétylation des substrats non-histones

Outre les histones, un certain nombre de substrats non-histones cytoplasmiques et nucléaires sont également cibles de l'acétylation réversible¹¹¹. Des analyses phylogénétiques ont du reste révélé que des enzymes de la famille des HDAC étaient exprimées dans des bactéries connues pour être dépourvues d'histones. Cela suggère que l'acétylation et la désacétylation des protéines non-histones sont des processus biologiques très conservés et qu'à un stade primitif de l'évolution, les HDAC désacétylaient essentiellement des protéines non-histones^{112,113}. Un exemple de protéine non-histone nucléaire pouvant subir une acétylation réversible est le facteur de transcription p53, qui fait partie de la famille des protéines codées par les gènes suppresseurs de tumeurs. L'acétylation de p53 est associée à des conséquences biologiques diverses telles que l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la sénescence ou encore l'apoptose cellulaire.

De nombreuses HAT telles que Tip60, MOF, p300/CBP, PCAF sont impliquées dans l'acétylation de p53¹¹⁴⁻¹¹⁶. L'HAT p300 en acétylant p53, produit un changement conformationnel favorable à l'augmentation de son activité transcriptionnelle¹¹⁷. Tip60 stimule directement l'activité apoptotique de p53 par son activité acétyltransférase au niveau du résidu lysine K120¹¹⁶. Tip60 protège également l'activité transcriptionnelle de p53 de la dégradation protéasomique en se fixant à MDM2 (*Murine double minute 2*), une ubiquitine ligase E3 et antagoniste majeur de p53^{118,119}. Parmi les HDAC intervenant dans la désacétylation de p53, nous pouvons citer HDAC1, HDAC2, HDAC3, et SIRT1^{120,121}. D'autres facteurs de transcription ont aussi été identifiés comme substrats cibles des processus d'acétylation et de désacétylation tels que Ku70¹²², la sous-unité RelA du facteur nucléaire κ B (NF- κ B)¹²³, ou la

protéine proto-oncogène c-Myc¹²⁴. Les HDAC qui catalysent le retrait du groupement acétyle du résidu lysine acétylé sont notamment des HDAC de classe I et III¹²²⁻¹²⁵. En particulier, SIRT1, HDAC de classe III, par son activité désacétylase NAD⁺ dépendant, est capable de moduler l'activité d'autres régulateurs transcriptionnels impliqués dans l'apoptose ou la survie cellulaire (p53, NF-κB)^{121,123} ou dans le métabolisme (FOXO et PPARγ)^{126,127}.

I.5. Fonctions biologiques d'HDAC6 associés aux substrats non-histones

Bien que des tests de réaction enzymatique suggèrent qu'HDAC6 est capable de désacétyler les histones *in vitro*¹³, il n'existe à ce jour aucune preuve formelle permettant de témoigner de cette même activité HDAC *in vivo*. La question du statut des histones en tant que cibles physiologiques d'HDAC6 reste donc discutée¹²⁸. Les modifications post-traductionnelles par acétylation et désacétylation peuvent se produire sur des substrats cytoplasmiques. À ce propos, HDAC6 est une enzyme connue pour catalyser préférentiellement le retrait des groupements acétyles situés sur des substrats cytoplasmiques plutôt que sur les histones, ce qui lui permet d'intervenir dans diverses fonctions cellulaires^{57,129} (Tableau II). Quelques effets physiologiques majeurs spécifiques dans lesquels ces processus sont impliqués seront décrits dans le cadre de cette étude.

Substrats	Sites de désacétylation	Fonctions associées à HDAC6	Références
Tubuline α	K40	infection virale, inflammation, immunité, maturation neuronale, résilience des microtubules	130-133
Cortactine	K87/K124/K161/K189/K198/ K235/K272/K309/K319	régulation du cytosquelette d'actine, motilité cellulaire, différenciation des mégacaryocytes	134,135
Hsp90	K294	maturation des récepteurs aux glucocorticoïdes	77
RIG-I	K858/K909	reconnaissance de l'ARN viral	136,137
Tat	K48	Suppression de la transactivation du HIV	138
Ku70	K539/K542	Suppression de l'apoptose	122
β -Catenin	K49	coactivation de la transcription génique médiée par IRF3	139,140
PrxI/PrxII	K197/K196	régulation du statut redox intracellulaire	141
Survivin	K129	fonction anti-apoptotique	142
MYH9		régulation de la liaison à l'actine	143
Hsc70		repliement protéique	143
DNAJA1		repliement protéique	143
HSPA5	K447	suppression des métastases du cancer du sein	144,145
HMGN2	K2	Régulation de l'activité de STAT5a et de la croissance tumorale du sein	146
Sam68		régulation de l'épissage alternatif	147
14-3-3 ζ	K49/K120	fonction anti-apoptotique	148
K-RAS		régulation de l'activité oncogénique de KRAS	149
ERK1	K72	régulation de l'activité kinase d'ERK1	150,151
Tau	K259/K353	régulation de la phosphorylation et de la dégradation de tau dans les oligodendrocytes	76,152

Tableau II. Substrats d'HDAC6 et fonctions associées (Tableau adapté à partir de Li et al, 2012⁵⁷ et de Zheng et al., 2017¹²⁹)

1.5.1. Régulation de la dynamique du cytosquelette

1.5.1.1. Tubuline

Les microtubules sont des polymères cylindriques creux obtenus par l'assemblage de 13 protofilaments composés d'un empilement de tubulines α et β . Leur stabilisation est obtenue par des protéines associées aux microtubules (MAP). Ce sont des constituants majeurs du cytosquelette qui interviennent dans des fonctions cellulaires cruciales, notamment la formation du fuseau mitotique qui assure la ségrégation des chromosomes pendant la division cellulaire ou le trafic intracellulaire¹⁵³. Parmi tous les substrats connus d'HDAC6, la tubuline α est celui qui a été le mieux caractérisé jusqu'à présent. La désacétylation médiée par HDAC6 se produit au niveau du groupement amino- ϵ du résidu lysine K40 intra-luminale de la tubuline^{56,73,154}. L'acétylation de la tubuline sur ce même site est catalysée par l'acétyltransférase cytoplasmique ATAT1 (*Alpha-tubulin N-acetyltransferase 1*)¹⁵⁵. Il est à noter que le résidu K40 est le site d'acétylation le mieux connu des microtubules polymérisés. Il convient donc de considérer que les études qui évoquent l'acétylation des microtubules ou de la tubuline α , font largement référence à cette modification précise¹³⁰.

L'acétylation de la tubuline α au niveau du résidu K40 est associée aux microtubules stables et de longue durée de vie. Des travaux ont montré que cette modification post-traductionnelle aurait pour fonction de faciliter le recrutement vers les microtubules de protéines telles que les kinésines^{156,157}, HSP90¹⁵⁸, ou les enzymes impliquées dans la fragmentation des microtubules comme la katanine¹⁵⁹.

Par ailleurs, des études génétiques et structurales utilisant des souches mutantes de *Caenorhabditis elegans* ont suggéré que l'acétylation de la tubuline est nécessaire au maintien de l'intégrité des microtubules¹⁶⁰ et à la limitation du nombre de protofilaments dans les neurones récepteurs du toucher¹⁶¹.

De plus, l'acétylation du résidu K40 intra-luminale augmente la résilience des microtubules et les protège contre le vieillissement mécanique¹⁶². Le modèle mécanistique de Xu et al. propose que l'acétylation par ATAT1 de la tubuline joue un rôle dans la protection des microtubules contre le risque de rupture provoquée par des stress mécaniques réguliers¹³¹(Figure 8). Selon ce modèle, la flexion du segment de microtubule induite par le stress mécanique crée des ouvertures transitoires de la paroi latérale, ce qui permet l'entrée de ATAT1 au sein de la lumière du microtubule^{131,154}. L'acétylation subséquente des résidus K40 intra-luminaux induite par ATAT1 modifie localement les propriétés mécaniques du microtubule, ce qui le protège contre une éventuelle rupture physique dans les zones soumises à des contraintes mécaniques

répétées. Du reste, la déplétion de ATAT1 augmente la fréquence de rupture des microtubules induite par le stress mécanique¹³¹.

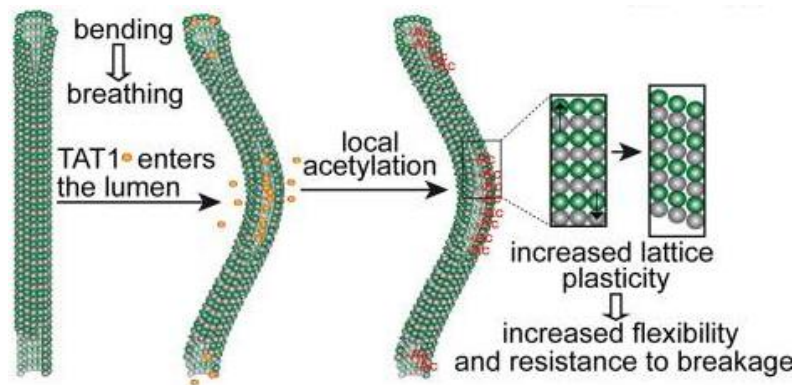


Figure 8. L'acétylation de K40 protège les microtubules contre le risque de rupture mécanique (d'après Xu et al 2017¹³¹)

En plus de réguler l'architecture des microtubules, l'acétylation des tubulines est impliquée dans divers processus cellulaires, notamment le transport intracellulaire^{156,157}, l'assemblage ciliaire¹⁶³, la migration cellulaire¹³³ et la polarité¹³². En particulier, l'acétylation de la tubuline régule les réponses immunitaires¹⁶⁴, le stress cellulaire¹⁶⁵, l'inflammation^{166,167} et les infections virales¹⁶⁸, ce qui suggère des rôles potentiellement importants dans des conditions délétères.

L'acétylation de la tubuline α interviendrait également dans des fonctions avancées, telles que l'apprentissage et la mémoire¹⁶⁹. Il a ainsi été démontré dans un modèle murin que cette modification post-traductionnelle joue un rôle dans le développement du cortex cérébral¹³³. Un déficit en ATAT1 perturbe en effet la capacité de migration des neurones du cortex. Une répression d'HDAC6 ou une hyperexpression d'une tubuline mimant la tubuline acétylée au niveau du résidu K40 permet de restaurer la capacité migratoire ainsi que les défauts morphologiques des neurones du cortex déficitaires en ATAT1, ce qui suggère que le statut d'acétylation de K40 modifié par ATAT1 et HDAC6 contrôle la migration et la transition morphologique des neurones du cortex.

Dans les lymphocytes T, l'acétylation des tubulines régule la polarisation du centrosome vers la synapse immune¹³². Une hyperexpression d'HDAC6 perturbe la translocation du centrosome dépendante de l'antigène et désorganise les clusters CD3 et LFA-1 des lymphocytes T formés au niveau de la synapse immune. Un pan-inhibiteur des HDAC, la trichostatine A (TSA) permet de réverter ces effets.

1.5.1.2. Cortactine

La cortactine (CTTN) est une protéine monomérique du cytoplasme, capable de se lier à l'actine F. Elle peut être activée par des stimuli externes pour favoriser la polymérisation et le remodelage du cytosquelette d'actine, ce qui lui permet ainsi d'intervenir dans des fonctions biologiques telles que la migration cellulaire¹⁷⁰.

La CTTN est un substrat acétylable par les enzymes CBP¹⁷¹ et p300¹⁷² et désacétylable par HDAC6¹³⁴, SIRT1¹⁷² et SIRT2¹⁷³. L'acétylation diminue la liaison de la CTTN à KEAP1 et inhibe la migration cellulaire¹⁷¹. L'hyperexpression d'HDAC6 entraîne une hypoacétylation de la CTTN, tandis que l'inhibition de l'activité d'HDAC6 entraîne une hyperacétylation de ce même substrat. HDAC6, en modifiant le statut d'acétylation de la CTTN, régule l'activité de liaison de la CTTN à l'actine F et influence de ce fait la motilité cellulaire dépendante de l'actine¹³⁴.

Par ailleurs, l'axe HDAC6-CTTN permet de réguler positivement la différenciation mégacaryocytaire chez l'homme mais pas chez la souris¹³⁵.

1.5.2. Clairance des protéines mal repliées (misfolded) et ubiquitinylées du cytoplasme

En situation de stress cellulaire, HDAC6 intervient dans la clairance des protéines mal repliées ubiquitinylées du cytoplasme par au moins trois mécanismes majeurs décrits dans la littérature. Le premier mécanisme concerne la formation des agrésomes : HDAC6 capture les protéines ubiquitinylées pour les déplacer via le réseau des microtubules vers les agrésomes qui seront traités ultérieurement par autophagie⁵⁰. Le deuxième mécanisme renvoie au rôle d'HDAC6 dans la maturation autophagique¹³⁴ et le troisième se rapporte à l'induction par HDAC6 de l'expression des protéines chaperonnes par l'intermédiaire de la dissociation du complexe HSF1/HSP90¹⁷⁴ (Figure 9).

1.5.2.1. Formation des agrésomes

Lorsque le système ubiquitine-protéasome (UPS) est altéré ou dépassé, c'est-à-dire lorsque la production de protéines mal repliées et ubiquitinylées excède la capacité de dégradation par le protéasome, HDAC6 fixe les protéines ubiquitinylées à l'aide de son domaine de liaison à l'ubiquitine, puis assure le transport rétrograde des agrégats de protéines ubiquitinylées grâce à son interaction avec les dynéines, sur le réseau de microtubules, vers le centrosome¹⁷⁵. HDAC6 permet ainsi la formation des agrésomes en fonctionnant comme un pont entre les protéines polyubiquitinées et le réseau des microtubules^{50,176,177}.

Par ailleurs, l'équipe d'Iwata et al. a montré qu'HDAC6 est aussi responsable du recrutement et du transport rétrograde de la machinerie autophagique via le réseau des microtubules vers les agrésomes¹⁷⁶. Par conséquent, HDAC6 peut être considérée comme un capteur de stress cellulaire et joue un rôle clé dans la dégradation médiée par l'autophagie des agrégats de protéines cytotoxiques s'accumulant lorsque l'UPS est altéré¹⁷⁵.

1.5.2.2. Régulation de l'autophagie

HDAC6 joue un rôle majeur dans l'autophagie constitutive, une forme particulière d'autophagie indépendante des nutriments. Cette autophagie dite « basale », bien qu'elle ne soit pas essentielle à la survie, semble fonctionner comme un mécanisme de contrôle-qualité intracellulaire cruciale qui élimine sélectivement les agrégats de protéines aberrantes et les organites endommagés, souvent retrouvés dans diverses formes de maladies neurodégénératives¹⁷⁸. Plus précisément, HDAC6 est nécessaire à la maturation autophagique, et en particulier à la fusion autophagosome-lysosome. Ce processus est notamment contrôlé par l'intermédiaire de la régulation du statut d'acétylation de la CTTN, composant clé de la machinerie responsable de la polymérisation de l'actine F, mais aussi substrat d'HDAC6¹³⁴. En effet, dans des fibroblastes d'embryons de souris, l'expression d'une forme mutante acétylée de la CTTN inhibe la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes. À l'inverse, dans les cellules de phénotype sauvage ou exprimant une forme résistante à l'acétylation, le recrutement et la désacétylation de la CTTN induits par HDAC6 rend possible le remodelage de la F-actine impliquée dans la fusion autophagosome-lysosome, et donc la clairance des agrégats protéiques¹⁷⁹.

D'après une autre étude conduite par Liu et al.¹⁸⁰, HDAC6 jouerait également un rôle dans la dégradation autophagique survenant au cours d'une privation nutritionnelle, par la désacétylation de LC3B-II, un composant essentiel de la double-membrane de l'autophagosome, au lieu de la CTTN comme c'est le cas dans l'autophagie constitutive. L'inhibition pharmacologique ou la répression génique d'HDAC6 bloque partiellement la désacétylation de LC3B-II, ce qui empêche la dégradation de p62/SQSTM1 (*sequestosome-1*), protéine cargo présente au sein de l'autophagosome et impliquée dans la dégradation autophagique.

1.5.2.3. Induction de l'expression des protéines chaperonnes

HDAC6 est présent au sein d'un complexe répressif comprenant HSP90 (*heat shock protein 90*), p97/VCP (*valosin containing protein*) et HSF1 (*heat shock factor 1*)^{181,182}.

Au cours d'un stress protéotoxique, l'interaction entre HDAC6 et les protéines ubiquitinylées induit la dissociation de ce complexe par un processus ATP dépendant, ce qui entraîne le relargage de ses composants^{174,183}. La libération du facteur de transcription HSF1 permet son activation dans le cytoplasme. HSF1 activée se transloque vers le noyau, se trimérise et se lie aux séquences *HSE* (*heat shock element*), ce qui induit l'expression des gènes *hsp* et donc la production des protéines chaperonnes. Ces derniers exercent alors leurs rôles physiologiques en favorisant le repliement des protéines nouvellement synthétisées et en empêchant leur agrégation potentiellement toxique¹⁸⁴.

La protéine p97/VCP, un autre composant libérée à partir du complexe HDAC6-HSP90-p97/VCP-HSF1, est une ségrégase capable d'exercer des activités très diverses. Elle sépare les protéines des membranes au sein desquelles elles sont intégrées, facilite la dégradation protéasomale en dépliant les protéines mal repliées polyubiquitinylées ou ségrège les protéines de leurs partenaires, ce qui leur permet d'exercer leurs rôles physiologiques respectifs en aval¹⁸⁵. Les travaux de Boyault et al. montrent que p97/VCP est capable d'extraire la protéine HDAC6 à partir du complexe HDAC6-ubiquitine et ce faisant, permet la reformation du complexe p97/VCP-HDAC6. Cette étape intermédiaire serait nécessaire à la réassociation entre HSP90 et HSF1 et la restauration d'un état basal non stressé^{174,186}.

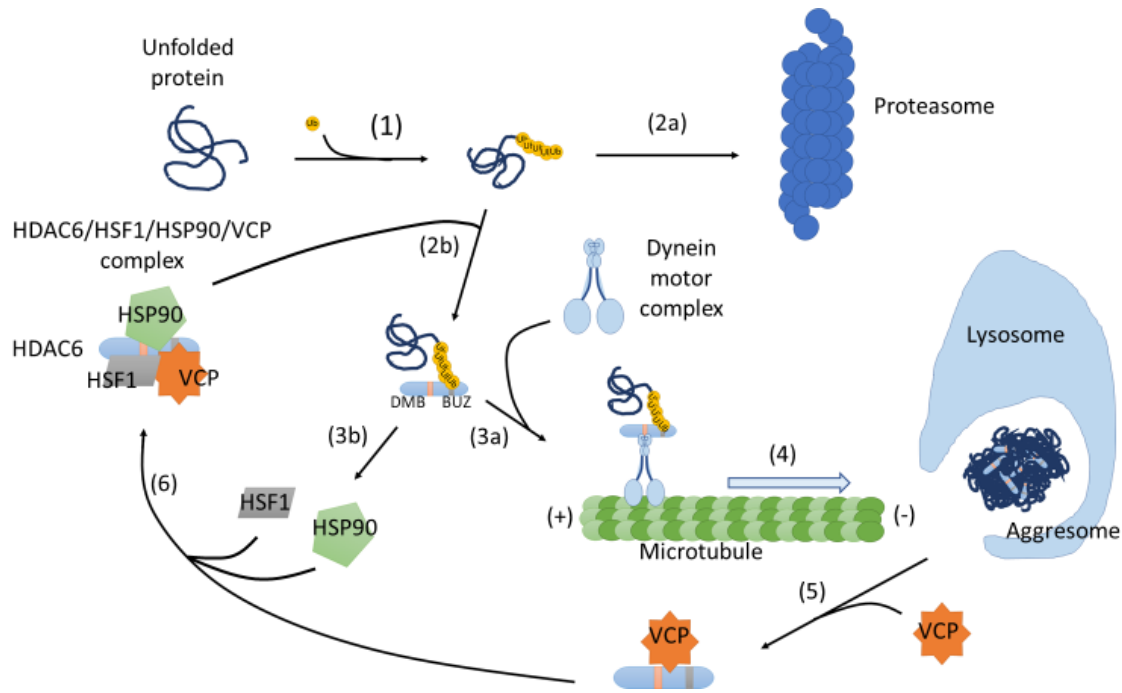


Figure 9. Clairance des protéines mal repliées ubiquitinylées.

Lors d'un stress protéotoxique, les protéines mal repliées sont marquées avec du poly-ubiquitine dans le cytosol (1) puis détruites par le système ubiquitine-protéasome (2a). Les protéines mal repliées qui sont polyubiquitinylées, mais qui ne sont pas détruites par le protéasome, sont reconnues par HDAC6. HDAC6 se lie aux chaînes d'ubiquitine libres (2b) et aux complexes moteurs de la dynéine (3a), ce qui permet le transport rétrograde des agrégats protéiques polyubiquitinylés potentiellement toxiques via le réseau des microtubules vers le centrosome, là où se forme l'agrésome et se déroule la dégradation par autophagie (4). En parallèle, la liaison d'HDAC6 aux protéines polyubiquitinées déclenche la dissociation du complexe HDAC6/HSP90/HSF1/VCP, ce qui entraîne l'activation de HSF1 (3b). Cela induit l'expression des gènes codant HSP70 et HSP27, protéines chaperonnes qui exercent un rôle protecteur contre les effets toxiques des agrégats dans les cellules. Par son activité ségrégase, l'AAATPase p97/VCP dissocie les complexes formés entre HDAC6 et les protéines polyubiquitinylées (5), ce qui favorise la reformation du complexe HDAC6/HSP90/HSF1/VCP et la restauration de l'état basal non stressé (6).

1.5.3. Régulation de l'activité chaperonne d'HSP90

Le repliement (folding) des protéines assisté par les chaperonnes est le processus par lequel les protéines acquièrent leur structure tertiaire fonctionnelle mature. Les chaperonnes eucaryotes forment une classe majeure de protéines comprenant les protéines de choc thermique (HSP) telles que HSP10, HSP20, HSP70, HSP90 ou encore HSPA5. Ces HSP sont des cibles de l'acétylation réversibles^{187,188}.

HSP90 intervient dans le repliement de nombreuses protéines de signalisation. En tant que cible d'HDAC6, HSP90 est hyperacétylée lorsqu'il se produit une invalidation génique ou

pharmacologique d'HDAC6. Cette hyperacétylation d'HSP90 induite par l'inactivation d'HDAC6 se traduit notamment par la perte de l'interaction entre HSP90 et p23, l'une de ses co-chaperonnes essentielles, ce qui entraîne la perte de l'activité chaperonne d'HSP90. Cela induit en conséquence un blocage de la maturation du récepteur des glucocorticoïdes, substrat d'HSP90⁷⁷.

Par ailleurs, des études *in vitro* montrent qu'une association entre des inhibiteurs d'HSP90 et d'HDAC6 exerce une activité anti-tumorale synergique, en empêchant la prolifération de cellules leucémiques exprimant des kinases oncogènes tels que BCR-ABL^{189,190}.

1.5.4. Régulation de l'apoptose

Plusieurs études ont montré qu'HDAC6 est impliquée dans la régulation de la voie phosphatidylinositol-3-kinase/protéine kinase B (PI3K/AKT) et celle des protéines kinases activées par des agents mitogènes (MAPK ou *Mitogen-activated protein kinases*) comprenant le signal ERK et la voie p38 qui jouent des rôles clés dans l'invasion et la métastase des cellules cancéreuses ainsi que dans la prolifération, la différenciation et la survie des cellules^{191,192}.

Selon les travaux de Ryu et al.¹⁹², l'inactivation d'HDAC6 provoque l'apoptose des cellules cancéreuses par deux voies : elle les détourne des voies anti-apoptotiques par l'induction de la déphosphorylation d'AKT et d'ERK d'une part, et favorise l'activation des voies pro-apoptotiques des cellules cancéreuses en augmentant la phosphorylation de p38 d'autre part. L'apoptose induite par A452, un inhibiteur pharmacologique d'HDAC6 est notamment signalée par l'activation de la caspase 3 et de la PARP, l'augmentation des molécules pro-apoptotiques BAK et BAX, ainsi que la diminution de la molécule antiapoptotique BCL-xL. De plus, l'inhibition sélective d'HDAC6 se traduit par une suppression de la capacité migratoire et invasive de divers types de cellules cancéreuses, ainsi que l'induction de dommages à l'ADN comme le montre l'augmentation de γ H2AX et l'activation de la kinase de contrôle CHK2¹⁹². Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui montrent qu'une inactivation pharmacologique ou une diminution de l'expression d'HDAC6 est associée à une diminution de la forme acétylée de Ku70, un composant clé de la réparation de l'ADN médiée par la voie NHEJ¹⁹³ et substrat cible de l'activité désacétylase d'HDAC6¹²². Ku70 est localisée dans le cytoplasme et est associée dans des complexes avec c-FLIP ou BAX, deux protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose¹⁹⁴.

La liaison entre Ku70 et c-FLIP ou BAX dépend du statut d'acétylation de Ku70. Lorsque Ku70

est acétylée, BAX protéine pro-apoptotique de la famille BCL2, est libérée de Ku70, ce qui provoque son activation et le déclenchement de l'apoptose¹²².

A l'inverse, c-FLIP, une protéine anti-apoptotique qui bloque l'activation de l'apoptose médiée par les récepteurs de mort¹⁹⁵ est dégradée lorsqu'elle est dissociée de Ku70 acétylée¹⁹⁴. Par ailleurs, une répression ou une invalidation pharmacologique d'HDAC6 conduit à une hyperacétylation d'HSP90^{77,194}. L'hyperacétylation d'HSP90 est associée à une augmentation de la dégradation d'AKT qui diminue les niveaux de MCL-1, protéine impliquée dans la séquestration de BAK. La diminution de MCL-1 favorise l'activation de BAK et le déclenchement de son action apoptotique¹⁹⁴.

I.6. Les inhibiteurs des HDAC dans le traitement du cancer

Plusieurs études associent une expression anormale des HDAC classiques (classe I, II, IV) à différentes formes de tumeurs malignes, y compris les tumeurs solides et hématologiques¹⁹⁶. Dans la plupart des cas, un niveau élevé d'HDAC est associé à une progression de la maladie et à de mauvais résultats chez les patients. Par exemple, une expression élevée d'HDAC1 ou d'HDAC3 est corrélée à un mauvais pronostic chez les patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire¹⁹⁷. Dans des cas de lymphome diffus à grandes cellules B, la surexpression d'HDAC1 est corrélée avec une faible survie¹⁹⁸. Les HDAC jouent un rôle essentiel dans la formation des tumeurs en intervenant notamment dans la désacétylation des protéines histones et non histones, qui sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose, de la réponse aux dommages à l'ADN, des métastases, de l'angiogenèse, de l'autophagie et d'autres processus cellulaires¹⁹⁶. Aussi, les inhibiteurs des HDAC (HDACi) représentent une classe thérapeutique prometteuse pour le traitement du cancer et de nombreuses molécules de structures très diverses ont été synthétisées, tels que des dérivés de l'acide hydroxamique, des benzamides, des carboxylates, des peptides cycliques et des cétones électrophiles^{70,199,200}. Actuellement, plusieurs HDACi sont évalués au cours d'essais cliniques dans le traitement de diverses formes de cancers. Leur efficacité a notamment été rapportée chez des patients atteints de myélome multiple en rechute/réfractaire ou de cancer du sein^{201,202}. Cependant, les HDACi tels que le panobinostat ou le vorinostat sont parfois associés, en raison de leur large spectre d'action, à la survenue d'effets secondaires sérieux et/ou graves comme la myélosuppression, la diarrhée ou la cardiotoxicité²⁰³. Compte tenu de la variabilité en termes de distribution tissulaire, de localisation cellulaire entre les différentes enzymes de la famille des HDAC et de la spécificité de relation qui unit les différentes formes de cancers avec chacune des HDAC, les

chercheurs ont alors émis l'hypothèse que l'amélioration de la sélectivité d'action des HDACi permettrait d'obtenir une meilleure marge thérapeutique ainsi que de réduire leurs effets indésirables (EI)²⁰³⁻²⁰⁶.

Dans ce contexte, HDAC6 représente une cible intéressante parmi les HDAC pour le traitement du cancer. En effet, cette enzyme est capable d'intervenir dans divers processus cellulaires telles que la clairance des protéines mal repliées, la régulation de l'apoptose ou l'autophagie par des mécanismes indépendants et dépendants de son activité désacétylase, comme il a été décrit précédemment. En raison de ces fonctions, plusieurs inhibiteurs sélectifs d'HDAC6 (HDAC6i) ont ainsi été développés tels que le ricolinostat (ACY-1215) ou le citarinosat (ACY-241). Les HDAC6i ont dernièrement fait l'objet de nombreuses études précliniques et cliniques en monothérapie ou en association avec d'autres agents anti-cancéreux pour le traitement de diverses formes de pathologies tumorales, hématologiques et solides^{207-217,217-224}.

En plus de leur activité antitumorale intrinsèque, les HDAC6i en combinaison avec d'autres molécules ont ainsi montré des intérêts thérapeutiques variés *in vitro* et *in vivo*. Ces inhibiteurs permettent de surmonter la résistance aux inhibiteurs du protéasome dans les cellules de MM, en perturbant l'activation de la voie alternative de l'agrésome-autophagie²¹⁴. Ils peuvent être utilisés à la place des pan-inhibiteurs des HDAC en combinaison avec les IMiD dans le but de favoriser l'effet cytotoxique de ces dernières molécules sans interférer sur leur mécanisme fondé sur l'action du cereblon²¹⁵. Ils contribuent aussi à améliorer l'immunothérapie basée sur les inhibiteurs de points de contrôle. Les propriétés immunomodulatrices des HDAC6i sont ainsi exploitées afin d'augmenter l'immunogénicité dirigée contre les cellules tumorales, notamment par le renforcement de la réponse T, et de diminuer l'activation des voies immunosuppressives²¹⁶⁻²¹⁸. De plus, les HDAC6i sensibilisent les tumeurs immunologiquement « froides » en facilitant l'infiltration des lymphocytes CD8+ et NK et en diminuant la quantité de macrophages M2 pro-tumorigènes au sein du micro-environnement tumoral²¹⁹. Par ailleurs, les HDAC6i possèdent un effet potentiellement neuroprotecteur, qui trouve un intérêt dans la prévention de la survenue de la neuropathie périphérique induite par des molécules chimiothérapeutiques connues pour leur neurotoxicité telles que la cisplatine, la vincristine, ou les taxanes^{220,221}.

En utilisation seule dans le traitement anticancéreux, les études cliniques ne rapportent pas d'efficacité clinique suffisante des HDAC6i, la meilleure réponse étant notamment une stabilisation de la maladie qui a été observée chez des patients atteints de MM en rechute ou en rechute et réfractaire au bortézomib^{209,222}. C'est en association avec d'autres molécules chimiothérapeutiques que les HDAC6i affichent des résultats favorables en termes d'efficacité

et de tolérance dans différentes pathologies tumorales hématologiques ou solides^{207–213,222–225}. Par exemple, dans une étude de phase II²⁰⁷ visant à évaluer l'efficacité du ricolinostat en association avec bortézomib/dexaméthasone chez des patients atteints de MM récidivant ou récidivant et réfractaire, le taux de réponse globale (ORR) du traitement combiné avec le ricolinostat était de 37 %. Chez les patients réfractaires au bortézomib, il était de 14 %. La trithérapie a été bien tolérée, avec des effets toxiques hématologiques, gastro-intestinaux et constitutionnels modérés. Les HDAC6i représentent potentiellement une alternative thérapeutique plus sûre et mieux tolérée en comparaison avec les pan-inhibiteurs d'HDAC caractérisés par une moindre sélectivité. Il est à noter toutefois que les HDAC6i sont associés à la survenue d'effets secondaires indésirables non négligeables et notamment à des troubles hématologiques (anémie, thrombopénie, neutropénie)^{207–213,226}.

II. Déroulement de l'érythropoïèse

II.1. Généralités

L'érythropoïèse est le processus par lequel les globules rouges (GR), aussi appelés érythrocytes, sont produits. Chez les mammifères, il existe trois vagues de développement érythropoïétique. La première vague correspond à l'émergence dans les îlots sanguins du sac vitellin des érythroblastes primitifs, qui expriment les globines embryonnaires. Au cours de la deuxième vague, un progéniteur érythro-myéloïde émerge du sac vitellin et migre vers le foie fœtal, produisant des érythroblastes définitifs qui expriment principalement les globines adultes de la souris. Dans la troisième vague, la cellule souche hématopoïétique (CSH) émerge à partir de la région aorte-gonade-mésonephros (AGM). Sa présence est également signalée dans les principaux vaisseaux sanguins et le placenta. La CSH migre ensuite vers le foie du fœtus et finalement vers la moelle osseuse adulte (MO), produisant des érythroblastes définitifs^{227–229}. Par ailleurs, la production d'hémoglobine (HB) au cours du développement chez l'homme est codée par les clusters multigéniques de type α et β ²³⁰. L'érythropoïèse primitive, dérivée du sac vitellin, est caractérisée par l'expression de la globine ζ (issue du locus de la globine α) et de la globine ϵ (issue du locus de la globine β). À ~8 semaines de gestation, l'expression de ces dernières est réprimée et il se produit une commutation rapide vers l'expression de la globine α . La globine α représente alors la totalité de la production transcriptionnelle du locus globine α . Au niveau du locus de la globine β , une première commutation vers une globine fœtale (globine

γ) intervient pendant la vie fœtale, puis une seconde se produit vers la globine β adulte²²⁸ (Figure 10).

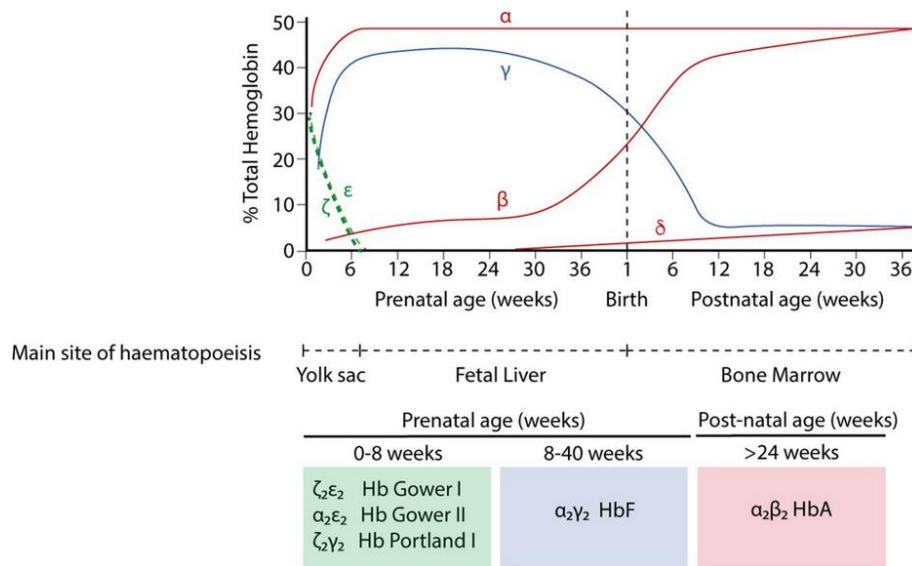


Figure 10. Commutation Hb au niveau des loci α - et β -globine humains.

Les globines embryonnaires sont représentées en vert, les globines fœtales en bleu et les globines adultes en rouge. Le type prédominant d'Hb correspondant à chaque stade de développement est indiqué (D'après King et al., 2018)²²⁸.

Dans ce travail, nous décrivons principalement la forme définitive de l'érythropoïèse qui se produit chez l'adulte. Ce processus peut être divisé en 3 étapes : l'érythropoïèse précoce, la différenciation érythroïde terminale et la maturation des réticulocytes. L'érythropoïèse précoce démarre à partir des CSH multipotentes présentes au sein de la moelle osseuse, qui prolifèrent et se différencient en progéniteurs érythroïdes engagés BFU-E (*burst forming unit- erythroid*) puis CFU-E (*colony forming unit - erythroid*) avant de devenir des proérythroblastes. Au cours de la différenciation érythroïde terminale, les proérythroblastes subissent entre quatre et cinq divisions mitotiques et se transforment successivement en érythroblastes basophiles, polychromatophiles puis acidophiles (ou orthochromatiques) avant d'énucléer pour aboutir au stade des réticulocytes. En fin de différenciation, les réticulocytes rétrécissent et acquièrent une forme discoïde devenant ainsi des GR matures aussi appelés érythrocytes²³¹(Figure 11).

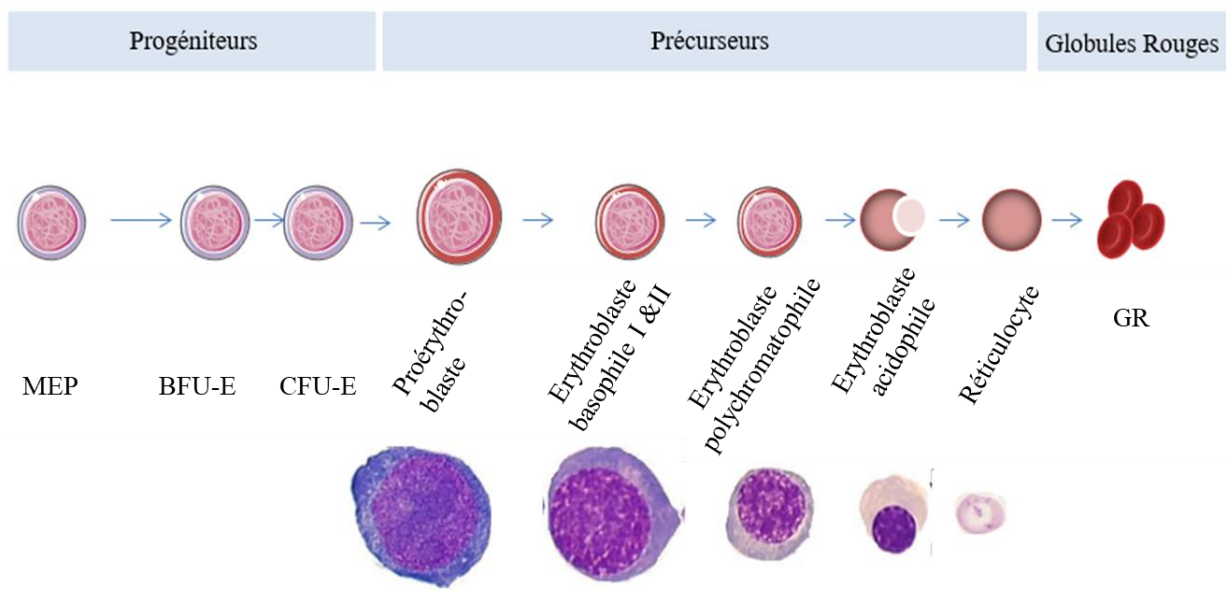


Figure 11. Étapes de la différenciation érythroïde.

II.2. Érythropoïèse précoce : cellules souches hématopoïétiques et progéniteurs érythroïdes

II.2.1. Les cellules souches hématopoïétiques

Les CSH sont des cellules rares qui sont capables de se maintenir tout au long de la vie par un processus d'auto-renouvellement. Ces cellules immatures se caractérisent également par leur pluripotentialité, c'est-à-dire leur capacité à générer des cellules progénitrices hématopoïétiques qui se différencient en chacun des types de cellule sanguines matures et fonctionnelles selon une hiérarchie bien définie²³². L'ensemble des mécanismes qui conduisent à la formation d'un système hématopoïétique complet à partir de la CSH est appelé hématopoïèse. Chez l'homme, l'hématopoïèse définitive débute dans l'embryon à partir de la première CSH identifiable qui apparaît dans la région aorto-gonado-mesonéphros environ au 28^{ème} jour du développement embryonnaire^{228,233}. Par la suite, l'hématopoïèse se déplace vers le foie fœtal, puis vers la moelle osseuse, où les CSH résideront durant tout le reste de la vie de l'organisme^{234,235}.

Selon le modèle classique de l'hématopoïèse, les différents types de cellules sanguines, dérivent selon un ordre spécifique de différenciation, des cellules souches multipotentes dont le potentiel de différenciation se restreint progressivement, en donnant naissance à des progéniteurs multipotents, qui deviennent par la suite oligopotents puis unipotents. Cependant, cette relation

hiérarchique reste débattue. Récemment, des études conduites chez la souris et chez l'homme ont montré une plus grande plasticité dans la destinée cellulaire^{236,237}. L'équipe de Notta et al. propose notamment un modèle dans lequel la moelle osseuse chez l'homme adulte ne comporte pas de progéniteurs oligopotents intermédiaires, mais une hiérarchie compartimentée en deux niveaux : le premier niveau correspondant aux cellules souches multipotentes telles que les CSH et les progéniteurs multipotents CFU-GEMM (Colony forming unit – granulocyte, erythrocyte, monocyte, megakaryocyte), et le deuxième niveau qui comprend les progéniteurs unipotents engagés. En revanche, les progéniteurs oligopotents restent conservés dans l'hématopoïèse foetale²³⁷ (Figure 12).

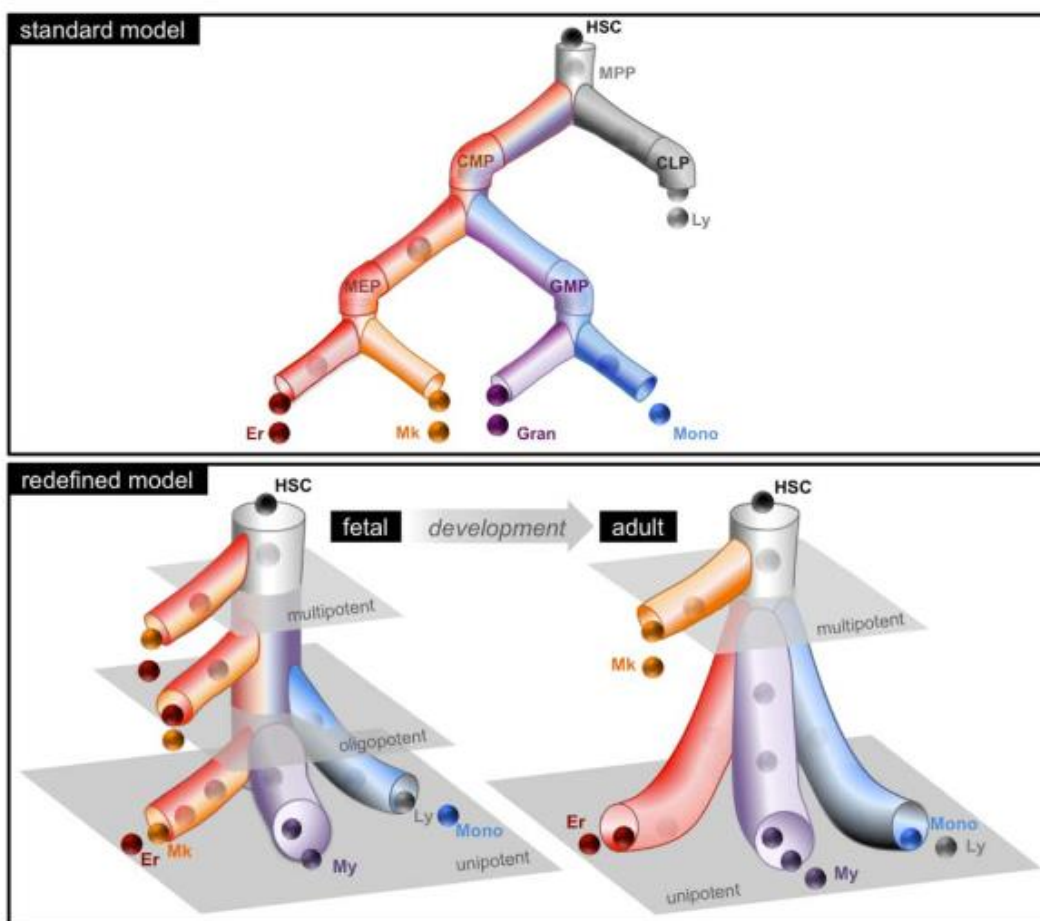


Figure 12. Modèle redéfini de l'hématopoïèse humaine.

Au cours du développement, il se produit un changement dans la compartimentation des cellules progénitrices se traduisant par le passage à une hiérarchisation en deux niveaux chez l'adulte. Le modèle standard est présenté à titre de comparaison (D'après Notta et al. 2016²³⁷).

La plupart des CSH sont maintenues à l'état quiescent et ne s'activent qu'en présence de stimuli externes de différenciation²³⁸. Cet état de dormance contribuerait à la préservation à long terme

des CSH, principalement en réduisant la réplication et l'activité métabolique²³⁹. La régulation fine des processus de dormance et de réveil des CSH est essentielle au bon fonctionnement de l'hématopoïèse. En effet, des CSH dormantes non réactives conduiraient à une insuffisance hématopoïétique due à un déficit de formation de cellules sanguines différenciées. D'autre part, des CSH très actives conduiraient à l'épuisement de la population et au défaut de maintien à long terme du système hématopoïétique^{240,241}.

Par ailleurs, les CSH sont capables de migrer rapidement dans le sang périphérique vers la cavité médullaire, ce qui permet de favoriser le rétablissement d'une hématopoïèse productive au niveau des zones médullaires lésées²⁴².

La cytométrie en flux couplée à l'analyse des marqueurs antigéniques de surface permet d'identifier les populations de cellules souches/progénitrices hématopoïétiques (CSPH). Les CSH et les progéniteurs les plus précoces sont notamment caractérisés par l'absence d'expression d'antigènes de cellules matures ainsi que par l'expression d'antigènes tels que cKit, le récepteur cellulaire de la cytokine SCF (*Stem cell factor*) ou encore la glycoprotéine transmembranaire CD34 (*Cluster of differentiation 34*). CD34 est principalement considérée comme un marqueur des CSPH. Cependant, elle est aussi exprimée à la surface d'autres types de cellules non hématopoïétiques, notamment les progéniteurs endothéliaux vasculaires ou les fibroblastes embryonnaires. La plupart des greffes de CSPH sont réalisées pour des hémopathies malignes comme le myélome multiple ou le lymphome, bien que la transplantation puisse aussi être recommandée pour traiter diverses affections non malignes telles que l'anémie aplastique sévère, les syndromes héréditaires d'insuffisance de la moelle osseuse ou encore la drépanocytose²⁴³. En pratique clinique, l'antigène CD34 est utilisé comme un marqueur sélectif de tri cellulaire qui permet d'enrichir la population de CSPH au sein du greffon^{232,244-246}.

II.2.2. Les progéniteurs érythroïdes

Les progéniteurs unipotents engagés dans la voie érythroïde dérivent des CSH multipotentes. Au cours de leur maturation, ils se multiplient tandis que leur taille diminue à mesure qu'ils passent par une série de stades différents de différenciation marqués par des changements graduels de leurs propriétés. Ces cellules sont peu fréquentes dans la moelle (environ 0,3 % des cellules mononucléées) et difficiles à isoler. C'est pourquoi leur existence et leurs caractéristiques ont été définies à partir de tests de clonogénicité qui évaluent leur capacité à générer *in vitro* une descendance hémoglobinisée dans des cultures clonales érythroïdes.

Le premier type de progéniteur érythroïde engagé ainsi identifié est la cellule BFU-E (*Burst Forming Unit - Erythroid*), qui porte ce nom en raison des colonies souvent multicentriques caractéristiques (d'où le terme de *burst* = éclatement) qu'il forme en milieu semi-solide. Ces colonies apparaissent dans les cultures de méthylcellulose après 5 à 8 jours chez la souris ou 10 à 14 jours chez l'homme. Les grandes colonies formées peuvent contenir jusqu'à plusieurs milliers de cellules hémoglobinisées²⁴⁷. Aussi, la moelle osseuse compte environ 40 à 120 BFU-E pour 10⁵ cellules²⁴⁸.

Les BFU-E les plus précoces possèdent des propriétés physiques et fonctionnelles communes aux cellules souches pluripotentes et aux autres cellules progénitrices engagées dans des lignées non érythroïdes. Aussi, elles présentent un potentiel prolifératif élevé et leur croissance dépend de plusieurs facteurs, dont les plus importants sont le facteur de croissance des cellules souches (SCF), la thrombopoïétine (TPO), l'interleukine 3 (IL3), l'IL11 et le FLT3-ligand²⁴⁹. Ce sont des cellules mobiles que l'on retrouve dans le sang périphérique. Comme pour les CSH, leur capacité à circuler représente une fonction physiologique majeure car elle permet de redistribuer les cellules de la moelle osseuse en cas de lésions locales au sein du microenvironnement médullaire²⁴⁸.

Ces progéniteurs précoces donnent ensuite naissance après différenciation aux CFU-E (*Colony Forming Unit - Erythroid*), qui forment de petites colonies de 16 à 125 cellules. Ces dernières apparaissent après 2 à 3 jours chez la souris ou 5 à 8 jours chez l'homme dans une culture en méthylcellulose. Les CFU-E sont cinq à huit fois plus abondantes que les BFU-E dans la moelle osseuse²⁴⁹. Les formes les plus tardives de CFU-E présentent davantage de similitudes avec les précurseurs érythroïdes qui en dérivent et peu de points communs avec les BFU-E primitives. Elles disposent notamment d'un potentiel prolifératif limité et ne sont pas capables d'auto-renouvellement. De plus, leur croissance est extrêmement sensible à l'érythropoïétine (EPO).

II.3. Différenciation érythroïde terminale

II.3.1. Les précurseurs érythroïdes

Les précurseurs érythroïdes sont issus de la différenciation à partir des CFU-E. La première cellule érythroïde identifiable morphologiquement est le proérythroblaste. Au cours de la différenciation érythroïde terminale, le proérythroblaste subit quatre ou cinq divisions mitotiques et une série de modifications morphologiques avant de donner naissance à des cellules érythroïdes matures. Sa descendance comprend les érythroblastes basophiles (Baso-E),

qui sont les premières cellules filles, suivies des érythroblastes polychromatophiles (Poly-E) puis orthochromatiques (Ortho-E). La maturation des précurseurs érythroïdes est caractérisée par une expansion progressive (1) des érythroblastes à travers un nombre limité de divisions cellulaires symétriques, (2) une accumulation d'hémoglobine, (3) une diminution de la taille des cellules, (4) une pyknose nucléaire et (5) une diminution du contenu en ARN²³¹.

Les critères morphologiques permettant de distinguer ces cellules reposent principalement sur la condensation nucléaire progressive associée à des modifications de la coloration cytoplasmique, qui reflètent la concentration intracellulaire en hémoglobine et le contenu en ARN. Plus précisément, l'accumulation graduelle de protéines spécifiques aux cellules érythroïdes telles que l'hémoglobine s'accompagne de l'atténuation progressive de la basophilie cytoplasmique liée à l'ARN^{248,250}.

II.3.2. Rôle des modifications post-traductionnelles des histones dans la condensation nucléaire

Au cours de la différenciation des érythroblastes de mammifères, la chromatine se condense progressivement du stade proérythroblastique jusqu'au stade acidophile tandis que la concentration en hémoglobine augmente. Ce processus est nécessaire à l'extrusion des noyaux pyknotiques des réticulocytes naissants. Du proérythroblaste à l'érythroblaste orthochromatique, le volume du noyau diminue jusqu'à atteindre 1/10e de son volume d'origine avec une chromatine hautement condensée²⁵¹⁻²⁵³.

La condensation de la chromatine implique des modifications post-traductionnelles s'effectuant au niveau des résidus des queues des histones²⁵⁴. Parmi celles-ci, figurent notamment la désacétylation des histones qui est contrôlée par la régulation positive des histones désacétylases HDAC2 et HDAC5 ainsi que par la régulation négative des histones acétyltransférases (HAT) telles que GCN5, ELP3, HAT1 et TIP60^{255,256}.

Dans des érythroblastes de foie fœtal de souris cultivés *in vitro*, il a été montré que le facteur de transcription MYC a un effet dose-dépendant sur la différenciation érythroïde terminale et joue un rôle important dans la régulation de l'énucléation. Sa diminution progressive est essentielle à la maturation érythroïde terminale. En effet, l'expression ectopique de MYC à des niveaux physiologiques entraîne un blocage spécifique de l'énucléation sans affecter la maturation érythroïde terminale. En particulier, l'expression continue de MYC perturbe la désacétylation de plusieurs résidus lysine dans les histones H3 et H4 qui sont habituellement désacétylées pendant la maturation érythroïde et c'est notamment par l'intermédiaire de la régulation positive de GCN5 que MYC intervient dans l'inhibition de la condensation nucléaire

et de l'énucléation. En revanche, la surexpression de MYC à des niveaux supra-physiologiques favorise la prolifération des érythroblastes précoces au détriment de la différenciation et provoque une réponse apoptotique²⁵⁶.

Par ailleurs, miR-191, un microARN exprimé par les cellules érythroïdes est capable de bloquer la condensation chromatinienne et l'énucléation par la répression de ses gènes cibles MXI1 et RIOK3, tous deux nécessaires au déroulement de ces processus. Il a été suggéré que la régulation positive de MXI1 et de RIOK3 pendant la différenciation érythroïde terminale soit nécessaire à la modulation négative de l'activité de MYC, à la régulation négative de l'expression de GCN5, et aux processus de condensation chromatinienne et d'énucléation qui en découlent²⁵⁷ (Figure 13).

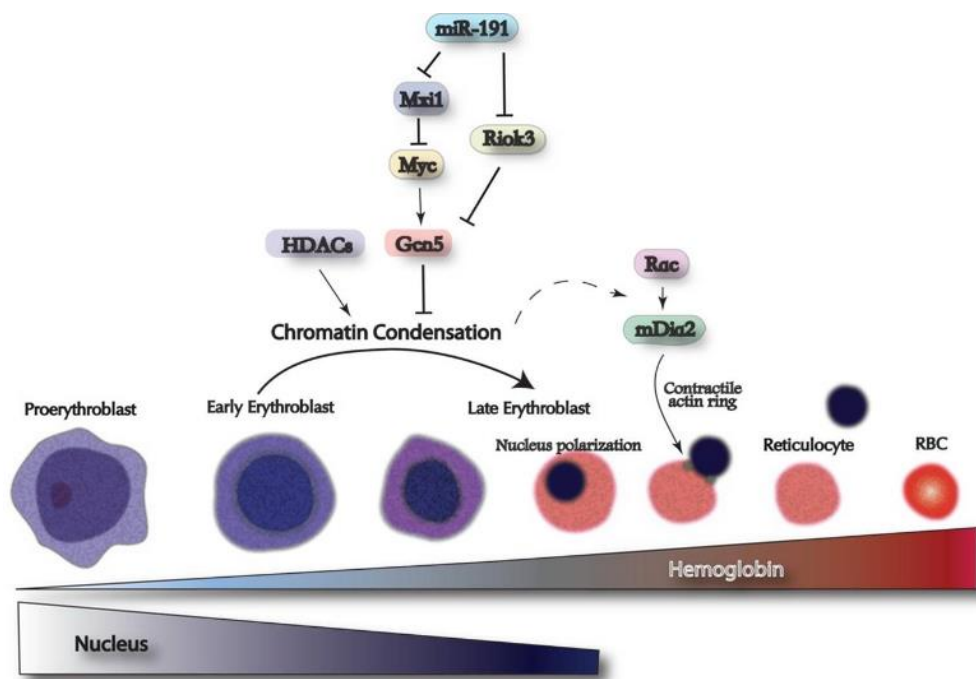


Figure 13. Condensation nucléaire et énucléation au cours de la maturation érythroïde terminale.

Au cours de la différenciation des érythroblastes de mammifères, la chromatine se condense progressivement. Ce processus implique la désacétylation des histones qui est contrôlée par la régulation positive des histones désacétylases (HDAC) et la régulation négative des histones acétyltransférases (GCN5). GCN5 est directement régulé par MYC, dont le niveau diminue progressivement au cours de l'érythropoïèse. miR-191 régule négativement MYC et GCN5 par l'intermédiaire de la répression de ses gènes cibles MXI1 et RIOK3. Par la suite, la condensation de la chromatine pourrait activer la voie Rac-GTPases-mDia2, qui est nécessaire à la formation de l'anneau contractile d'actine (CAR ou contractile actin ring) et à l'énucléation (D'après Ji et al. 2011²⁵¹).

Le processus de condensation nucléaire est, en outre, associé au statut de méthylation de l'ADN. À l'échelle du génome, les analyses du méthylome montrent une déméthylation progressive et globale de l'ADN tout au long de l'érythropoïèse murine et humaine^{258,259}. Chez l'homme, ce sont les gènes, les séquences intergéniques et les régions flanquant les îlots CpG qui sont préférentiellement déméthylés²⁵⁹. Cependant, plusieurs études ont montré que la méthylation de quelques résidus lysine spécifiques situés au niveau des queues des histones est impliquée dans la condensation nucléaire. C'est le cas par exemple du résidu lysine situé en position 20 de l'histone H4 (H4K20) sur lequel un groupement méthyle peut être ajouté par SETD8, une méthyltransférase fortement exprimée par les érythroblastes. Dans un modèle murin, la délétion de SETD8 entraîne une létalité embryonnaire associée à une anémie sévère. Ces effets sont accompagnés d'une altération de la condensation chromatinienne et de l'accumulation d'hétérochromatine, au sein des érythroblastes déficients en SETD8²⁶⁰.

La monométhylase Suv4-20h2, qui convertit la forme bi-méthylée du résidu lysine situé en position 20 de l'histone H4 (H4K20me2) en forme tri-méthylée (H4K20me3), pourrait également être impliquée dans la condensation nucléaire qui survient au cours de la maturation érythroïde. Une étude de Heldin et *al.* a en effet montré que son knockdown au sein de fibroblastes humains entraîne une augmentation de la fraction de cellules en phase S, un défaut de sortie du cycle cellulaire ainsi qu'une diminution de la compaction de la chromatine. Aussi, d'autres études sont nécessaires afin de vérifier son rôle potentiel dans la maturation érythroïde²⁶¹.

Par ailleurs, les travaux de Feng et *al.* montrent dans un modèle murin que la méthylation de H3K79 est nécessaire à l'érythropoïèse embryonnaire. DOT1L (*Disruptor of telomere silencing 1-like*) est une histone méthyltransférase qui méthyle spécifiquement l'histone H3 au niveau du résidu lysine 79 (H3K79). Chez les souris déficientes en DOT1L, une létalité embryonnaire associée à une anémie sévère survient à la mi-gestation, bien que l'étude ne confirme pas un lien direct entre l'anémie due à déficit de DOT1L et le processus de condensation nucléaire²⁶².

II.3.3. Export et dégradation des protéines nucléaires

Lorsque le noyau n'est plus nécessaire à la survie et à la fonction des érythroblastes tardifs, il se produit une migration vers le cytoplasme de nombreuses protéines nucléaires liées à l'ADN, telles que les histones H2A et H3.

L'exportine nucléaire 7 (XPO7), spécifique à la lignée érythroïde, joue un rôle dans l'élimination de ces protéines nucléaires. Une répression génique d'XPO7 au sein des

érythroblastes primaires de foie fœtal de souris entraîne une inhibition sévère de la condensation de la chromatine et de l'énucléation, ainsi que la persistance des histones dans les noyaux²⁶³. Le facteur 1 de type Krüppel (KLF1 ou EKLF pour *Erythroid Krüppel-like factor*) est un facteur de transcription essentiel au développement érythroïde, comme le démontre la mort de souris déficientes en KLF1 vers E14 en raison d'un déficit en érythrocytes fonctionnels²⁶⁴. Chez l'homme, le variant KLF1 Nan, une substitution d'un seul acide aminé (p.E339D) dans le domaine de liaison à l'ADN, provoque des défauts dans la maturation érythroïde²⁶⁵. Le séquençage de l'ARN montre que le gène *XPO7* est régulé négativement dans les cellules hépatiques de fœtus de souris de KLF1 Nan, ce qui contribue potentiellement à l'augmentation de la taille des noyaux. Ainsi, le facteur de transcription KLF1 pourrait être impliqué dans la condensation nucléaire par l'intermédiaire de la régulation de l'expression de l'exportine *XPO7*²⁶⁶.

Par ailleurs, des études récentes ont montré que la protéase à cystéine caspase 3 est capable de créer une ouverture nucléaire dans les érythroblastes de souris, voire plusieurs chez l'homme qui permet l'évacuation des histones vers le cytoplasme par un processus indépendant de l'action de *XPO7*^{267,268}. Ce processus ne semble pas se dérouler de façon passive, étant donné que toutes les histones majeures ne sont pas libérées et que des protéines nucléaires non-histones subsistent dans le noyau, malgré la présence d'une ouverture nucléaire. Aussi, il est possible que les histones qui s'agrègent autour de l'ouverture nucléaire jouent un rôle protecteur en la scellant de manière à bloquer la libération d'autres protéines nucléaires²⁶⁷. Il est à noter que la caspase-3 est connue pour intervenir dans la maturation des progéniteurs érythroïdes humains. Des études antérieures montrent en effet que cette protéase est activée de manière transitoire par la voie mitochondriale au cours de la différenciation des érythroblastes et clive des protéines impliquées dans l'intégrité du noyau (lamine B) et la condensation de la chromatine (acinus)²⁶⁹. Bien que la caspase 3 soit également mobilisée dans le processus d'apoptose, son activation au cours de l'érythropoïèse normale n'induit pas l'apoptose ou le clivage de GATA1, facteur de transcription majeur de la différenciation érythroïde²⁶⁹⁻²⁷¹. Il a été démontré que la protéine chaperonne HSP70 est capable de protéger GATA1 de la protéolyse médiée par la caspase-3 grâce à son domaine de liaison aux peptides, et donc de prévenir l'induction de l'apoptose dans les précurseurs érythroïdes en cours de différenciation terminale²⁷².

WDR26 (*WD repeat-containing protein 26*) est une autre protéine impliquée dans la

dégradation des protéines nucléaires ainsi que dans la condensation nucléaire dans les érythroblastes en cours de différenciation. Elle intervient par deux mécanismes. Tout d'abord, WDR26 fonctionne comme une sous-unité centrale du complexe ubiquitine ligase GID qui entraîne la polyubiquitination de la lamine B et de l'histone H2A, processus ayant pour effet de conduire à la dégradation de ces protéines nucléaires par le système ubiquitine-protéasome. Ensuite, WDR26 contrôle la formation de l'ouverture nucléaire transitoire médiée par la protéolyse de la lamine B. L'ouverture nucléaire permet la libération rapide des histones principales et d'autres protéines nucléaires vers le cytosol où se produit leur dégradation. La dégradation de la lamine B étant nécessaire à la formation de l'ouverture nucléaire, une accumulation de lamine B dans les érythroblastes déficients en WDR26 entraîne une altération de la formation de l'ouverture nucléaire et de la condensation nucléaire dans des érythroblastes murins en cours de différenciation^{267,268} (Figure 14).

Ensemble, ces études permettent de montrer l'importance du rôle de la libération des histones dans le cytosol au cours de la condensation nucléaire des cellules érythroïdes en maturation.

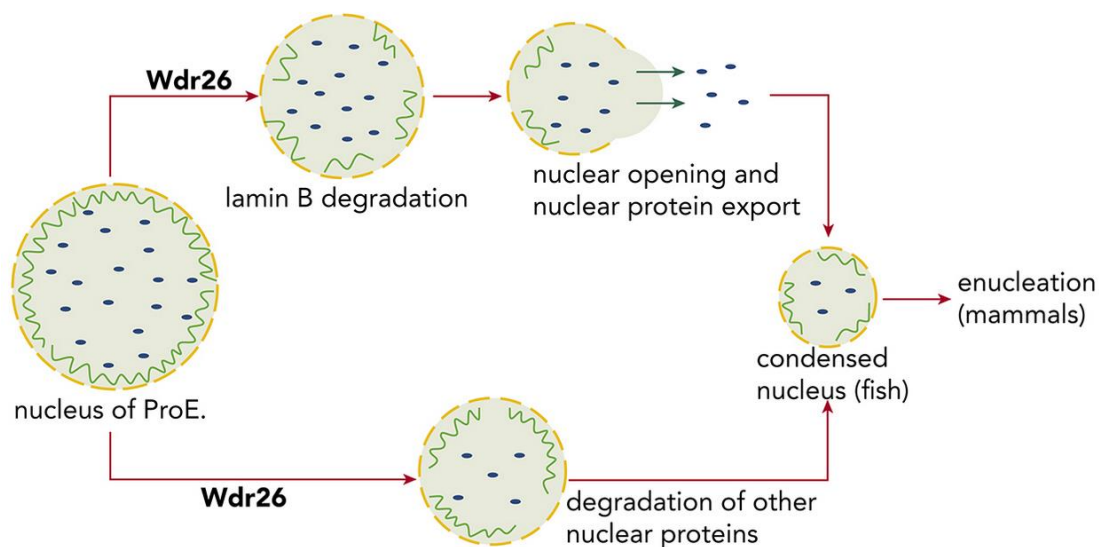


Figure 14. Rôle de WDR26 dans la condensation nucléaire et l'énucleation dans les érythroblastes en cours de maturation.

WDR26 induit la dégradation des protéines nucléaires et la formation transitoire d'une ouverture nucléaire permettant l'export et la clairance rapide des protéines nucléaires, ce qui favorise la condensation nucléaire puis l'énucleation (D'après Zhen et al., 2020²⁷³).

II.3.4. Énucléation

Chez les mammifères, la dernière étape de maturation des précurseurs érythroïdes est l'énucléation. Ce processus aboutit à la formation de deux types de cellules filles à partir des érythroblastes orthochromatiques : les réticulocytes et les pyrénocytes²³¹.

Les réticulocytes formés possèdent la majeure partie du cytoplasme et de l'hémoglobine, ainsi que les protéines nécessaires à la formation d'un réseau cytosquelettique²⁷⁴⁻²⁷⁷. Leur concentration en hémoglobine est maximale après leur entrée dans le sang périphérique²⁷⁸. Les pyrénocytes contiennent le noyau condensé entouré d'une fine couche de cytoplasme et d'une bicouche lipidique²⁷⁹. Peu après leur formation, les pyrénocytes sont rapidement phagocytés par les macrophages de l'îlot érythroblastique qui reconnaissent à leur surface un signal « mangez-moi » tel que la phosphatidylsérine²⁸⁰.

L'énucléation est un processus complexe se déroulant en plusieurs étapes. Il nécessite notamment l'établissement de la polarité cellulaire par les microtubules, processus par lequel le noyau hautement condensé migre vers un bord de la cellule, suivi de la formation d'un anneau contractile d'actomyosine (CAR) au niveau du sillon de clivage et de la coalescence des radeaux lipidiques entre le réticulocyte naissant et le pyrénocyte²⁸¹⁻²⁸³.

Avant la polarisation cellulaire, les réseaux de microtubules s'organisent en une structure radialement symétrique en forme de cage qui entoure le noyau. Lors de la polarisation, les microtubules forment un réseau asymétrique qui rayonne vers le cortex cellulaire à partir d'une zone étroite située entre le noyau et la membrane plasmique, tandis que le noyau se déplace dans la direction opposée. L'inhibition de la polymérisation de la tubuline par la colchicine a pour effet d'abolir la polarisation cellulaire, le noyau restant localisé au centre de la cellule²⁸¹. Selon Wang et al., la PI3K jouerait un rôle dans l'énucléation médiée par la polarisation cellulaire. PI3K serait ainsi capable de s'activer localement à la suite de la réorganisation du cytosquelette microtubulaire depuis un réseau radial vers un réseau asymétrique. L'accumulation asymétrique des produits phosphorylés de PI3K au niveau de la partie cytoplasmique de la membrane stimulerait ensuite leurs effecteurs tels que l'actinine α , la profiline ou la gelsoline, ce qui aurait pour effet de favoriser les processus asymétriques d'assemblage et de désassemblage de l'actine. En conséquence, la pression générée par les contractions de l'actomyosine cytoplasmique déplacerait le noyau viscoélastique vers le bord de la cellule et provoquerait son extrusion²⁸³ (Figure 15).

La dynéine est une protéine motrice reliée aux microtubules qui est impliquée dans le transport unidirectionnel de vésicules depuis la membrane vers le centrosome (extrémité positive des microtubules)^{284,285}. Sa fonction de transport vésiculaire est impliquée dans le déplacement du noyau et son extrusion, bien que la nature de ce qui est transporté via le réseau de microtubules ne soit pas connue. Sous inhibition de la dynéine, la polarisation cellulaire, la prolifération des CFU-E ainsi que l'énucléation sont bloquées²⁸⁶.

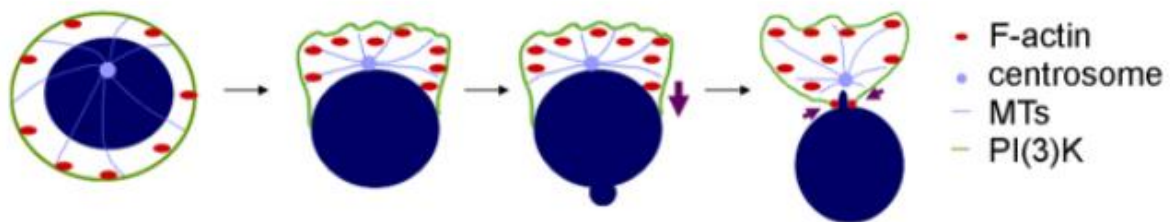


Figure 15. Modèle proposé pour la régulation de l'énucléation des érythroblastes médiée par PI3K.

La réorganisation du cytosquelette microtubulaire depuis un réseau radial vers un réseau asymétrique entraîne une activation localisée de PI3K. Ce processus a pour effet de favoriser l'assemblage asymétrique de l'actine. L'énucléation est ensuite déclenchée et maintenue par une pression générée par les contractions de l'actomyosine cytoplasmique (grande flèche). Cette pression est probablement complétée par les contractions de l'actomyosine concentrée au niveau du sillon de clivage (petites flèches) (D'après Wang et al., 2012²⁸³).

Sous le contrôle des GTPases Rac, l'actine s'assemble avec la myosine de manière à former un anneau contractile d'actomyosine (CAR) dans le sillon de clivage entre le pyrénocyte et le réticulocyte naissant. La chaîne légère régulatrice de la myosine (CLRM) est ensuite phosphorylée, ce qui permet au complexe d'actomyosine de se contracter puis d'induire l'extrusion nucléaire. Par ailleurs, il a été postulé que les radeaux lipidiques, coordonnés par les GTPases Rac qu'ils contiennent, se regroupent de façon à positionner favorablement le CAR au niveau du sillon de clivage et à orienter les vésicules sécrétoires vers la formation d'une nouvelle membrane et l'extrusion nucléaire^{281,287} (Figure 16).

Selon Ouled-Haddou et al., la glutathione peroxidase 4 (GPX4) joue un rôle dans la formation de ces rafts lipidiques ainsi que dans la phosphorylation de la CLRM au sein des érythroblastes orthochromatiques humains. Pendant l'énucléation, la GPX4 se localise dans les radeaux lipidiques organisés au niveau des sillons de clivage entre les réticulocytes et les pyrénocytes. Son inhibition perturbe le regroupement des radeaux lipidiques et la phosphorylation de la CLRM et entrave fortement l'énucléation par un mécanisme indépendant de la ferroptose. Cependant, l'addition de cholestérol permet d'augmenter la phosphorylation de la CLRM et de rétablir partiellement l'énucléation malgré la suppression de la GPX4²⁸⁸.

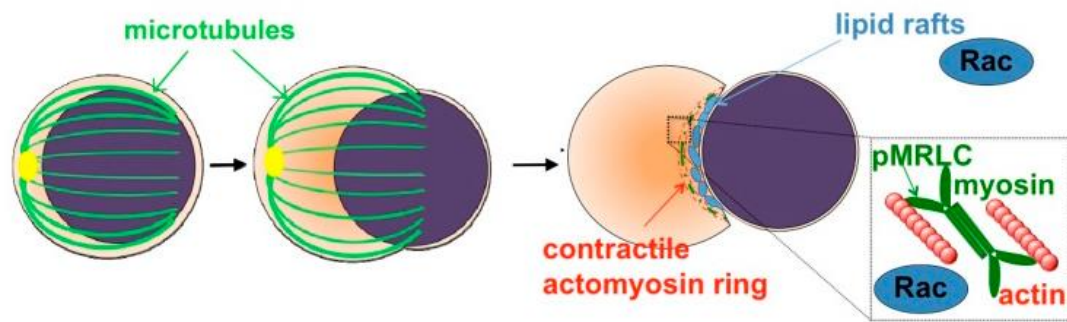


Figure 16. Modèle illustrant le processus d'énucléation des érythroblastes.

Les microtubules contribuent à l'établissement de la polarité dans les érythroblastes orthochromatiques. L'actine, sous le contrôle des GTPases Rac, s'assemble avec la myosine pour former un anneau d'actomyosine dans le "sillon de clivage" entre le noyau et le réticulocyte naissant. La phosphorylation de la CLRM permet au complexe d'actomyosine de se contracter. Les radeaux lipidiques, coordonnés par les GTPases Rac qu'ils contiennent, se regroupent au niveau du sillon de clivage, ce qui permet probablement de positionner favorablement le CAR et de diriger les vésicules sécrétoires vers la formation d'une nouvelle membrane et la séparation du noyau (D'après Konstantinidis et al., 2012²⁸¹).

Dans les érythroblastes de souris, mDia2, protéine effectrice de la famille des formines joue un rôle important dans l'énucléation. Ce nucléateur d'actine favorise en effet la formation de l'anneau contractile d'actomyosine (CAR). mDia2 est régulé par acétylation et désacétylation au niveau du résidu lysine K970 situé dans le domaine d'homologie 2 de la formine. Sa désacétylation par HDAC6 dans les érythroblastes de souris conduit notamment à son activation, et subséquentement à la formation du CAR au niveau du sillon de clivage puis à l'énucléation²⁸⁹. Toutefois, il est à noter que des érythroblastes déficients en mDia2 peuvent conserver leur capacité d'énucléation, ce qui suggère que d'autres mécanismes sont impliqués dans ce processus²⁹⁰.

Plus récemment, il a été démontré que CDC42 (*Cell division control protein 42 homolog*), petite protéine G intracellulaire de la famille des Rho GTPases, est capable de réguler le système dynéine-tubuline et le système actine-myosine dans les érythroblastes humains, ce qui lui confère un rôle essentiel dans la polarisation et la formation du CAR. Une inhibition pharmacologique de CDC42 bloque la formation du CAR et perturbe la localisation et la distribution normales de la dynéine²⁹¹.

II.4. Les îlots érythroblastiques

II.4.1. Définition de l'îlot érythroblastique

L'îlot érythroblastique (IEB) est une structure multicellulaire composée d'un macrophage central entouré d'une trentaine de cellules érythroïdes en cours de différenciation, qui constitue l'unité fonctionnelle de l'érythropoïèse définitive^{249,292-295}. Au sein de cette niche spécialisée, se déroule la différenciation érythroïde depuis les CFU-E jusqu'aux réticulocytes. Les IEB sont situés dans les organes érythropoïétiques tels que la moelle osseuse post-natale, le foie ou la rate du fœtus, et ne sont pas observés dans le sac vitellin^{249,294,296}.

II.4.2. Interactions entre les cellules érythroïdes en cours de maturation et le macrophage central au sein de l'îlot érythroblastique

Au sein de l'IEB, les interactions entre les cellules érythroïdes et le macrophage central jouent un rôle essentiel dans la régulation physiologique de la production de GR. Bien que la prolifération et l'énucléation des érythroblastes puissent se dérouler *in vitro* en l'absence de macrophages, ces processus restent relativement inefficaces en comparaison de ceux qui se produisent au cours de l'érythropoïèse *in vivo*^{297,298}.

Plusieurs molécules d'adhésion qui médient les interactions physiques entre les érythroblastes ou entre les érythroblastes et les macrophages ont été décrites, notamment la protéine macrophage-érythroblastes (EMP ou *erythroblast macrophage protein*), l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ et le récepteur VCAM-1 ou encore le récepteur ICAM-4 (Figure 17). La protéine EMP à la fois exprimée par les macrophages et les érythroblastes, médie l'attachement à l'IEB. EMP est nécessaire à la formation d'IEB ainsi qu'à la différenciation normale des lignées cellulaires érythroïdes et macrophages *in vivo*. Bien que les mécanismes précis restent à élucider, EMP est impliquée dans l'expulsion du noyau érythroïde et dans le développement des filopodes des macrophages, probablement par l'intermédiaire de son association avec l'actine^{299,300}. Le récepteur VCAM-1 exprimé à la surface des macrophages centraux joue également un rôle important dans la formation des IEB en interagissant avec l'intégrine VLA4 ($\alpha 4\beta 1$) exprimée par les érythroblastes. Dans un modèle murin, l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés soit contre VCAM-1, soit contre VLA4 perturbe le développement des IEB cultivés en présence d'érythropoïétine³⁰¹. Quant à ICAM-4, il s'agit d'un membre de la superfamille des immunoglobulines exprimé par les érythroblastes qui interagit avec l'intégrine αV , ligand exprimé par les macrophages. L'adhésion ICAM-4/ αV est crucial à la formation des IEB³⁰².

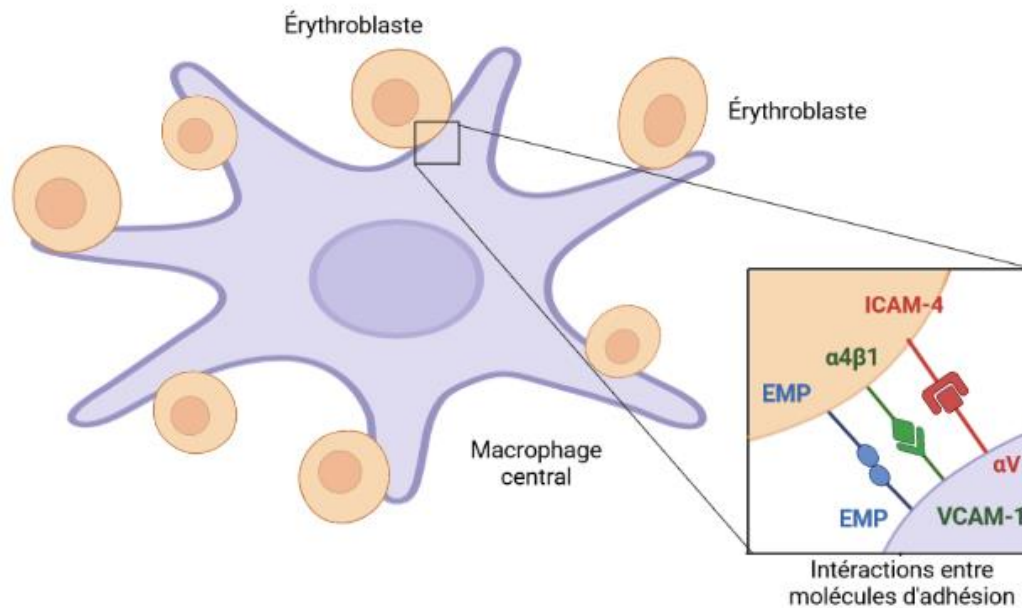


Figure 17. L'îlot érythroblastique.

Les érythroblastes en cours de maturation s'attachent à un macrophage central situé dans la moelle osseuse par l'intermédiaire de EMP, $\alpha 4\beta 1$ et ICAM-4. Le macrophage central assure la médiation de ces interactions par le biais de EMP, VCAM1 et αV respectivement.

La désoxyribonucléase 2-alpha (DNase II-alpha) est une endonucléase connue pour être impliquée dans l'érythropoïèse définitive. Elle est exprimée dans le macrophage central des îlots érythroblastiques (MCIEB), où elle participe à la digestion des noyaux extrudés des érythrocytes en développement³⁰³. KLF1 (*Krüppel-like factor 1*), encore appelé EKLF (*Erythroid Krüppel-like factor*), est un facteur de transcription clé des MCIEB, régule positivement l'expression des molécules d'adhésion ICAM-4 et VCAM1 ainsi que de la DNase II-alpha. Le déficit de KLF1 altère les interactions cellulaires et l'expulsion du noyau tout en induisant l'expression de l'IFN β qui diminue la production d'érythrocytes matures énucléés³⁰⁴. La réduction de l'expression de la DNase II-alpha qui en résulte diminue la capacité du MCIEB à digérer l'ADN des noyaux érythroïdes extrudés^{305,306}.

Des travaux ont en outre suggéré que l'activation du transducteur de signal et activateur de transcription 5 (STAT5) dépendante de l'EPO dans les macrophages exprimant l'EPOR (*Erythropoietin receptor*) de la niche splénique favorise la transition des progéniteurs érythroïdes de stress, depuis la prolifération vers la différenciation, par l'inhibition de la voie de signalisation WNT dans des modèles murin et humain³⁰⁷.

Il a longtemps été postulé que les MCIEB favorisent le développement des érythroblastes en leur fournissant des nutriments, comme le fer, et des cytokines, comme l'érythropoïétine. Une étude récente du profil d'expression génique conduite sur des macrophages murins knock-in EPOR-eGFPcre permet de corroborer ces fonctions potentielles associées au soutien de l'érythropoïèse. Parmi les molécules fortement exprimées par ces cellules, figurent notamment les facteurs de croissance IGF1, IL-18 et VEGFB qui pourraient intervenir dans la prolifération érythroïde³⁰⁶. Ces macrophages sécrètent également de nombreuses protéines impliquées dans le recyclage du fer : ce sont par exemple les molécules liées à la phagocytose telles que le récepteur à phosphatidylsérine TIM4³⁰⁸, la tyrosine kinase membranaire MERTK^{309,310}, les molécules liées au métabolisme de l'hème telles que SPIC et HMOX1, ou encore la ferroportine et la transferrine. Leur production suggère que les MCIEB peuvent constituer une source de fer nécessaire au processus d'érythropoïèse se déroulant dans les IEB³⁰⁶.

II.5. Maturation des réticulocytes

Les réticulocytes, cellules érythroïdes énucléées, migrent vers le sang périphérique où ils achèvent leur maturation dans un environnement qui les soumettent à des contraintes de cisaillement et des interactions capillaires/spléniques. Les réticulocytes sont des cellules plus fragiles et moins déformables en comparaison avec les érythrocytes matures : elles se fragmentent plus facilement sous l'effet d'une contrainte de cisaillement. La maturation réticulocytaire convertit un réticulocyte multilobulé en un disque biconcave avec une meilleure viscoélasticité³¹¹. Il s'agit d'un processus complexe qui entraîne une perte d'environ 20 % de la surface de la membrane plasmique, une réduction du volume cellulaire, une association accrue du cytosquelette à la membrane plasmique externe et la perte de tous les organites cytoplasmiques résiduels, y compris des mitochondries et des ribosomes^{312,313}. L'élimination des organites se fait à la fois par autophagie et par exocytose³¹⁴.

Trois événements majeurs mécaniquement liés sont nécessaires à la maturation des réticulocytes circulants en GR matures : le contrôle du volume, le remodelage de la membrane et la vésiculation³¹⁵. Le volume cellulaire moyen d'un réticulocyte une fois libéré dans la circulation est de 115 fL et diminue à 85 fL chez le GR mature, tandis que la concentration cellulaire en hémoglobine (CCH) augmente de 27 à 33 g/dL. Le volume cellulaire et la CCH restent remarquablement stables pendant la majeure partie de la durée de vie normale des

érythrocytes³¹⁶.

II.5.1. Contrôle du volume cellulaire

La perte de volume des réticulocytes peut être attribuée d'une part, à la perte des membranes et des protéines associées à la vésiculation et d'autre part, à l'action des transporteurs qui régulent les concentrations intracellulaires ioniques et le déplacement d'eau, et donc le volume cellulaire.

Parmi ces transporteurs, figure le cotransporteur de chlorure de potassium (KCC). Physiologiquement, le KCC est le médiateur de la réduction du volume des réticulocytes qui permet d'augmenter la concentration cytoplasmique des GR matures en hémoglobine³¹⁷. L'activation du KCC entraîne un efflux net de KCl à partir des cellules à forte teneur en potassium, qui s'accompagne d'une perte d'eau et d'une réduction du volume cellulaire. Le KCC est actif dans les réticulocytes et diminue avec la maturation des globules rouges³¹⁸⁻³²⁰.

PIEZO1 est une protéine de canal ionique mécanosensible, qui joue également un rôle dans la régulation du volume cellulaire³²¹. Le mode d'action de PIEZO1 dans les GR a été mis en évidence par l'équipe de Cahalan et *al.* qui a montré dans des modèles de souris knock-out PIEZO1, que l'ouverture des canaux PIEZO1 entraîne une augmentation transitoire de la concentration cytoplasmique en Ca^{2+} ³²². L'influx calcique provoque ensuite l'activation des canaux potassiques Gárdos Ca^{2+} dépendants qui induisent un efflux accru de K^+ accompagné par une fuite d'eau vers le milieu extracellulaire³²³ (Figure 18).

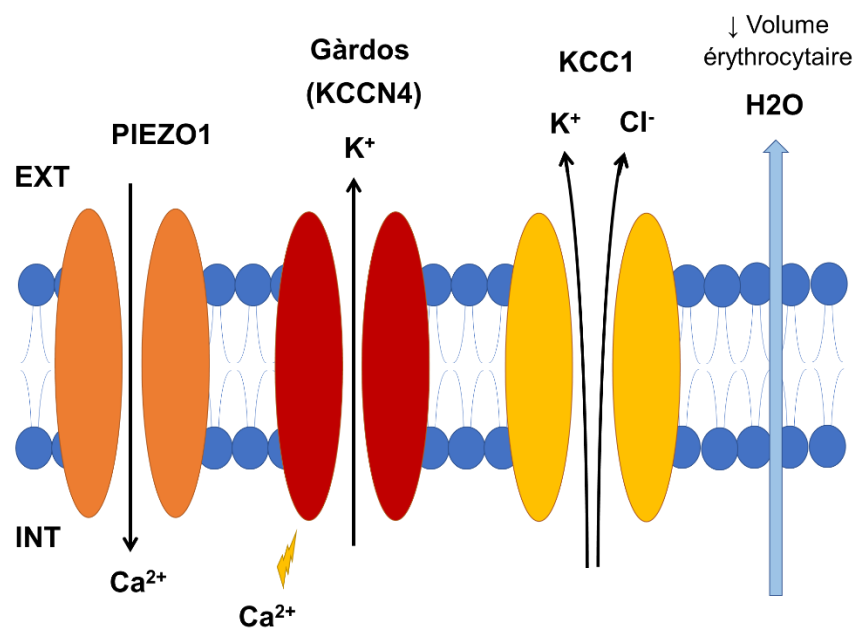


Figure 18. Rôle joué par les canaux ioniques Gárdos (KCCN4), PIEZO1 et KCC1 dans le contrôle du volume cellulaire.

L'influx de Ca^{2+} médié par PIEZO1 active l'efflux de K^{+} par le canal Gárdos et le cotransporteur KCC entraînant un efflux net de KCl, processus qui s'accompagnent d'une perte d'eau et d'une réduction du volume cellulaire.

II.5.2. Remodelage membranaire

La maturation des réticulocytes se caractérise par un remodelage membranaire intense. Dans les GR, on trouve deux complexes membranaires majeurs : le complexe ankyrine et le complexe jonctionnel fondé sur la molécule 4.1 (Figure 19). Ces complexes sont reliés par un fin réseau cytosquelettique dont le principal constituant est la spectrine qui aide à maintenir la forme biconcave hautement spécialisée des érythrocytes. De nombreuses autres protéines sont comprises dans le réseau cytosquelettique comme l'actine, l'ankyrine R, la protéine 4.1R, la protéine 4.2, la p55, l'adducine, la dématine, la tropomyosine et la tropomoduline³²⁴. La protéine de transport bicarbonate/chlorure BAND3 (échangeur d'anions 1, AE1) chaperonnée par la glycophorine A (GPA) est le principal composant qui ancre ces deux complexes au cytosquelette de spectrine^{315,325,326}.

L'assemblage de ces grands complexes membranaires au cours de l'érythropoïèse est essentiel au maintien de l'intégrité structurelle des GR circulants³¹⁵.

Il a été démontré qu'un déficit en ankyrine entraîne une perturbation du réseau membranaire, notamment en empêchant BAND3 de former un complexe tétramérique qui constitue le cœur du complexe multiprotéique cytosquelettique membranaire. L'absence d'ankyrine provoque aussi une augmentation de la distribution de BAND3/GPA vers la membrane plasmique des pyrénocytes et une réduction de l'expression de ces protéines dans les réticulocytes³²⁷. Il est intéressant de noter que des protéines composant le complexe jonctionnel (GPC, XK et Kell) sont plus extractibles après traitement par détergent dans les réticulocytes que dans les GR matures, ce qui souligne un lien plus faible de ces protéines membranaires avec le cytosquelette de spectrine sous-jacent dans les réticulocytes. En revanche, les protéines du complexe d'ankyrine restent liées au cytosquelette (BAND3, Rh, RhAG et GPA), ce qui suggère qu'au cours de la maturation des réticulocytes, ce dernier complexe est déjà formé, tandis que le premier est encore en cours de remodelage et contribue plus tardivement à rendre la cellule plus stable et plus tolérante aux contraintes de cisaillement^{277,315}.

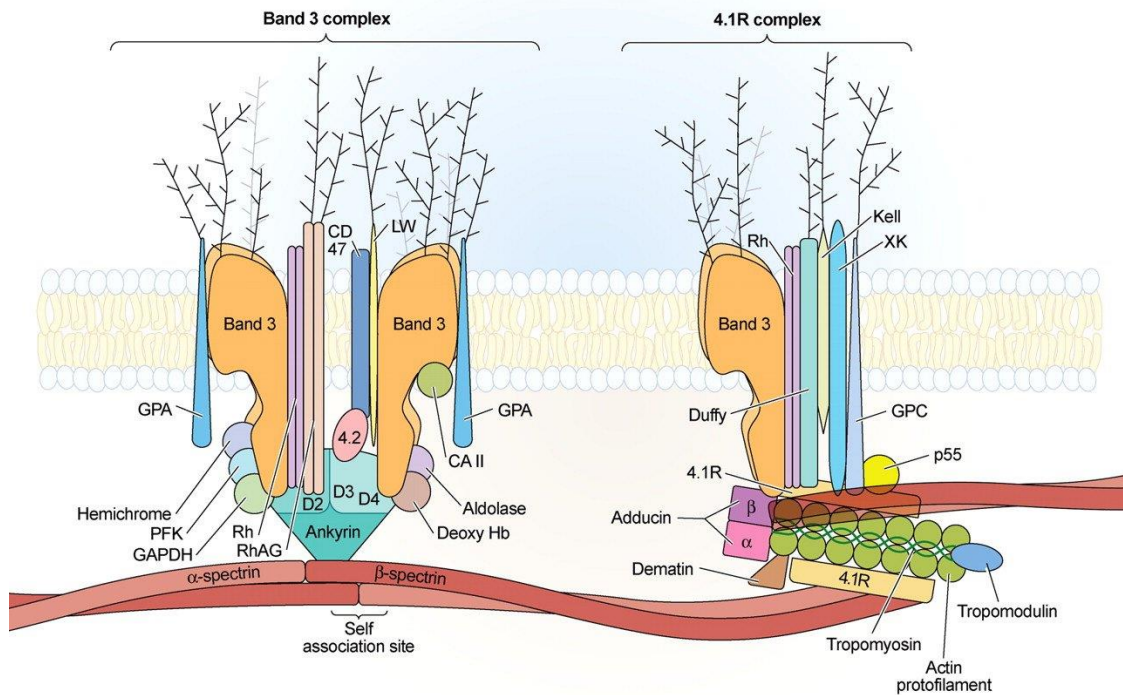


Figure 19. Remodelage membranaire.

Deux principaux complexes membranaires reliés par un cytosquelette sont impliqués dans le remodelage membranaire : les complexes BAND3-ankyrine (à gauche) et jonctionnel (à droite) (D'après Salomao et al., 2008³²⁸).

II.5.3. Vésiculation

La machinerie de transport endosomal ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) est constitué de complexes protéiques cytosoliques, appelés ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II et ESCRT-III³²⁹. Les complexes ESCRT forment un réseau qui recrute des protéines monoubiquitinylées et entraîne leur internalisation dans des vésicules luménales au sein d'un type d'endosome appelé corps multivésiculaire (CMV)³³⁰. Au cours de la maturation des réticulocytes, la machinerie ESCRT est exploitée de manière à éliminer les protéines situées à la surface de la membrane cytoplasmique, par la voie du CMV. Parmi ces protéines membranaires figurent notamment le récepteur à la transferrine 1 (TFR1) et l'aquaporine 1 (AQP1) qui sont ubiquitinylées et acheminées vers le CMV où ils sont triés par l'ESCRT puis évacués vers le milieu extracellulaire via la voie exosomale^{331,332} (Figure 20).

Plusieurs études indiquent que la fusion des endosomes multivésiculaires avec la membrane plasmique et la libération des exosomes pourrait être induite par un influx calcique. Dans la lignée érythroleucémique K562, l'arrimage et la fusion des CMV au niveau de la membrane

plasmique sont régulés par la GTPase Rab11 dépendante du calcium³³³. De plus, la transferrine stimule la libération d'exosomes d'une manière Ca²⁺-dépendante, ce qui suggère que la transferrine pourrait être un stimulus physiologique pour la libération d'exosomes³³⁴. Dans les GR humains, une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire ou une activation de la protéine kinase C entraîne la formation et la libération de microvésicules³³⁵.

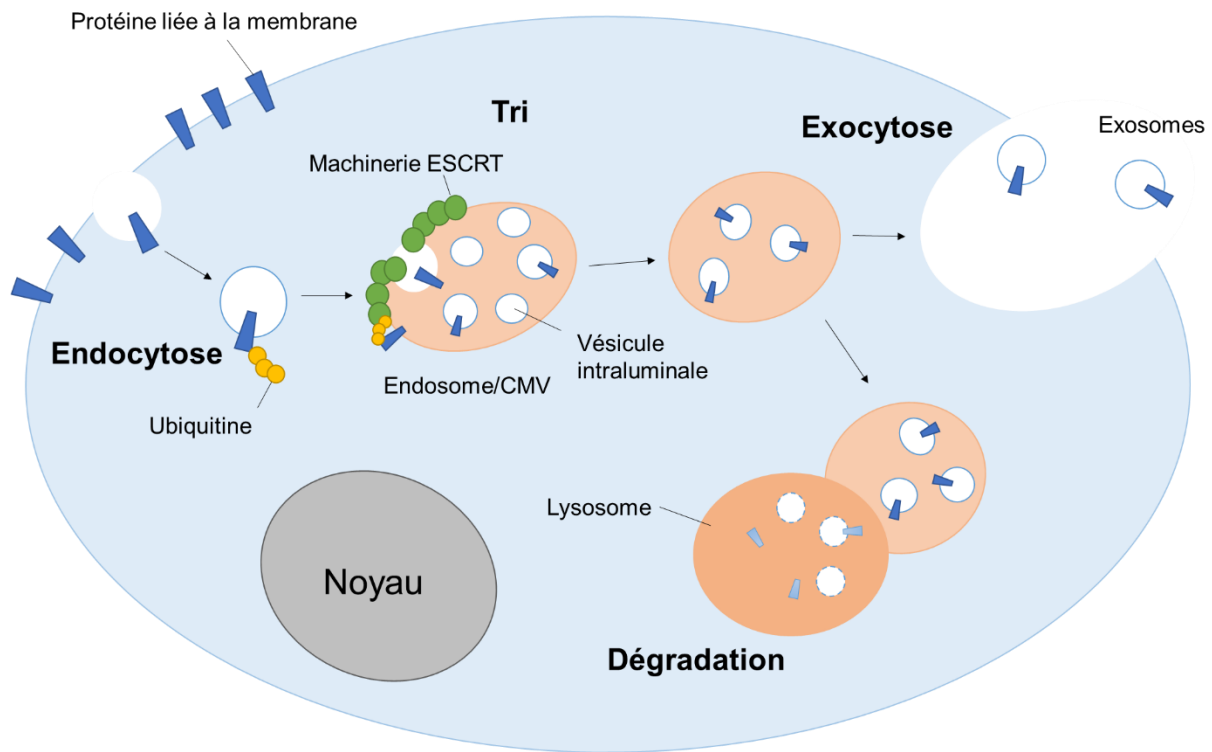


Figure 20. Processus de vésiculation.

La machinerie des corps multi-vésiculaires (CMV) médiée par l'ESCRT élimine les protéines liées à la membrane. Les protéines sont ubiquitinylées puis acheminées vers les corps multivésiculaires (CMV). Au cours du tri des CMV, la machinerie ESCRT génère des vésicules intraluminales qui transportent les protéines membranaires ubiquitinylées vers les lysosomes et entraînent ainsi leur dégradation. Par ailleurs, les CMV peuvent être adressés à la membrane plasmique pour libérer les exosomes par exocytose (Figure adaptée à partir de Schmidt et al., 2012³²⁹).

II.6. Caractérisation phénotypique des cellules érythroïdes au cours de leur maturation

La maturation érythrocytaire est non seulement caractérisée par des changements morphologiques des précurseurs érythroblastiques, mais aussi par une modification séquentielle de l'expression des antigènes de surface. En effet, différentes sous-populations cellulaires sont distinguables phénotypiquement en fonction de leur stade de maturation par cytométrie en flux

(CMF) à l'aide de la détection des marqueurs de surface (Figure 21). Il est à noter que ces marqueurs permettent aussi le tri cellulaire des différentes populations en fonction du phénotype exprimé (FACS).

Les CSH humaines résident dans la fraction $\text{Lin}^-/\text{CD34}^+/\text{CD38}^{-/\text{low}}$ des progéniteurs humains de moelle osseuse et de sang de cordon³³⁶. Cette fraction peut-elle même être subdivisée en trois sous-populations cellulaires en fonction de l'expression des marqueurs CD90 et CD45RA : $\text{CD90}^+/\text{CD45RA}^-$, $\text{CD90}^-/\text{CD45RA}^-$, et $\text{CD90}^-/\text{CD45RA}^+$. Majeti al. identifient les cellules $\text{Lin}^-/\text{CD34}^+/\text{CD38}^-/\text{CD90}^-/\text{CD45RA}^-$ comme une population candidate de progéniteurs multipotents humains dans le sang de cordon³³⁷.

L'engagement de la CSH dans la lignée érythroïde est ensuite identifiable par l'apparition de CD71 (ou TFR pour *Transferrin Receptor*), CD36, CD105, une légère diminution de CD45, et la perte de CD34³³⁸.

Ainsi, les progéniteurs BFU-E et CFU-E qui sont traditionnellement définies par des tests de colonie peuvent être caractérisées par les phénotypes $\text{CD45}^+/\text{GPA}(\text{CD235a})/\text{IL3R}^-/\text{CD34}^+/\text{CD36}^-/\text{CD71}^{\text{low}}$ et $\text{CD45}^+/\text{GPA}^-/\text{IL3R}^-/\text{CD34}^-/\text{CD36}^+/\text{CD71}^{\text{high}}$, respectivement³³⁹. Les marqueurs CD71/CD105 permettent une distinction plus fine des CFU-E, les plus immatures possédant le phénotype $\text{CD71}^{\text{high}}/\text{CD105}^{\text{med}}$ et les plus matures étant $\text{CD71}^{\text{high}}/\text{CD105}^{\text{high}}$ ³⁴⁰.

Le stade ultérieur de maturation du progéniteur érythroïde est suivi principalement par la production de GPA, de l'atteinte de l'intensité maximale de CD71, d'une diminution de CD36 et de la perte des marqueurs CD105, CD117 (c-KIT) et CD45³³⁸.

Plus précisément, les progéniteurs érythroïdes nucléés peuvent être classées à l'aide du couple CD105/CD117, en quatre sous-populations : pro-érythroblastes, érythroblastes basophiles, érythroblastes polychromatophiles et érythroblastes orthochromatophiles. L'expression de l'antigène CD105 est associée spécifiquement aux pro-érythroblastes et aux érythroblastes basophiles, tandis que le CD117 est exprimé au stade le plus précoce des pro-érythroblastes. CD105 et CD117 disparaissent progressivement au cours de la différenciation. Les pro-érythroblastes expriment un niveau intermédiaire de CD36 et GPA en surface. Leur différenciation est corrélée à une expression d'abord croissante des marqueurs CD36 et GPA sur les érythroblastes basophiles, puis décroissante du marqueur CD36, sur les érythroblastes polychromatophiles et orthochromatophiles³⁴¹.

Une fois que les niveaux maximaux de GPA et CD71 sont atteints, aucun nouvel antigène de

surface n'est identifié sur le progéniteur érythroïde. Cependant, la population érythroïde nucléée continue de proliférer. Les marqueurs CD71 et CD36 diminuent progressivement alors que le GPA est produit en continu pendant cette phase de prolifération, son intensité d'expression restant constante au cours des multiples divisions cellulaires³³⁸.

Les progéniteurs érythroïdes énucléés tardifs, tels que les réticulocytes et les érythrocytes matures, se caractérisent par l'absence de marquage avec les intercalants des acides nucléiques comme le SYTO16³⁴¹. D'après une étude de Wood et al., les réticulocytes forment une population CD71+ CD36+/- avec une forte expression de GPA, ce qui indique que l'extrusion nucléaire se produit avant la perte de ces deux antigènes. C'est notamment leur contenu élevé en ARN qui les démarquent des érythrocytes³⁴². Par ailleurs, Borrione et al. ont montré que les réticulocytes du sang périphérique pouvaient être caractérisés à l'aide d'une technique double combinant un marquage fluorescent de l'ARN par le thiazole orange (TO) avec l'analyse de l'expression du CD71. Cette approche a ainsi permis de distinguer les réticulocytes intermédiaires (TO^{low} /CD71^{med}) des réticulocytes matures (TO^{low} /CD71^{low}). En fin de différenciation, les érythrocytes matures perdent l'expression des marqueurs CD71, CD36, CD105, CD117, HLA-DR, CD38 et CD45, et n'expriment plus que la GPA³⁴³. Il se produit également une légère diminution de la coloration de DRAQ5 qui caractérise la perte d'ARN³⁴⁴.

Enfin, il est à noter que la combinaison du GPA, du CD49d (intégrine $\alpha 4$) et de la protéine de bande 3 (CD233) est utilisée pour isoler spécifiquement les cellules érythroïdes à tous les stades terminaux de l'érythropoïèse humaine, y compris les proérythroblastes, les érythroblastes basophiles précoces, basophiles tardifs, polychromatiques et orthochromatiques^{345,346}.

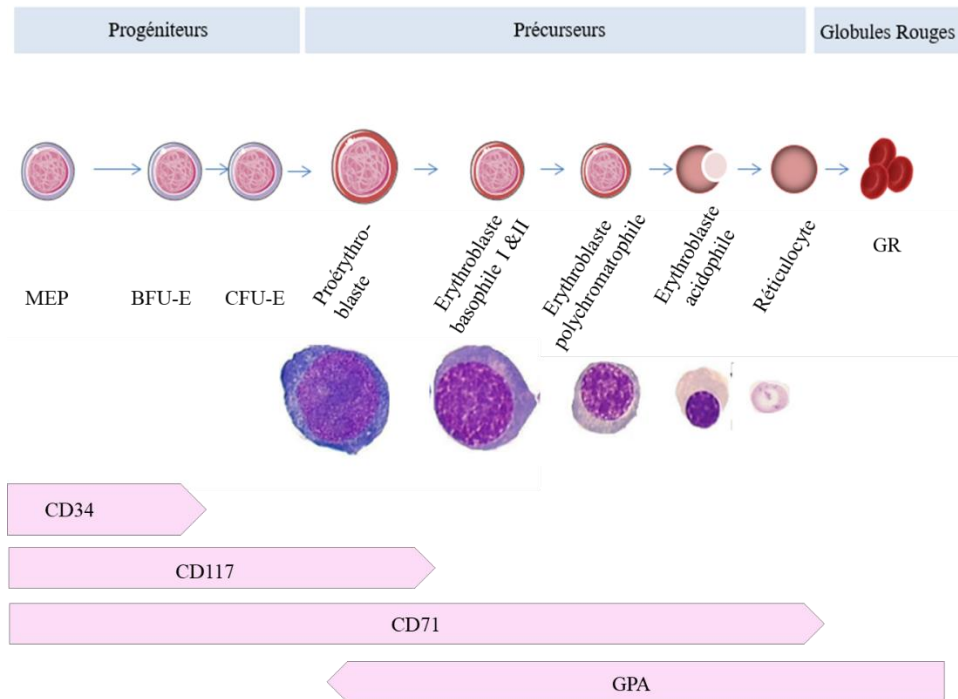


Figure 21. Expression de divers marqueurs de surface au cours de la maturation érythroïde.

III. Régulation de l'érythropoïèse

III.1. Régulation transcriptionnelle de l'érythropoïèse

III.1.1. GATA1, TAL1 et KLF1 : les principaux facteurs de transcription de l'érythropoïèse

Le développement érythroïde nécessite l'expression et l'activité coordonnée de plusieurs facteurs de transcription qui régulent la différenciation terminale et l'induction de gènes spécifiques de la lignée érythroïde. Les facteurs GATA1, TAL1 (SCL) et KLF1 (EKLF) sont tous trois nécessaires à l'érythropoïèse primitive et définitive et ont été désignés comme les « maîtres régulateurs » de la lignée érythroïde. Ensemble, ils forment le réseau transcriptionnel érythroïde central (*core erythroid transcriptional network* ou CEN)³⁴⁷. En effet, l'absence de l'une de ces protéines chez la souris entraîne une anémie sévère et la mort à mi-gestation³⁴⁸⁻³⁵⁰. Par ailleurs, le profilage de l'expression génétique a montré que ces trois facteurs sont nécessaires à l'expression des gènes de la β -globine (*HBB*) et de l' α -globine (*HBA*), ainsi qu'à l'induction d'un grand nombre d'autres gènes érythroïdes, ce qui suggère que GATA1, TAL1 et KLF1 fonctionnent de manière large et synergique dans la régulation du programme transcriptionnel érythroïde³⁵¹⁻³⁵³.

III.1.1.1. GATA1

GATA1 (*Gata binding protein 1*) est le premier facteur de transcription hématopoïétique identifié comme « régulateur maître »³⁵⁴. Il s'agit du membre fondateur de la famille des facteurs de transcription GATA qui contiennent chacun deux motifs en doigts de zinc et sont capables de fixer la séquence ADN « GATA ». GATA1 peut s'associer directement à plusieurs cofacteurs tels que la protéine à doigt de zinc FOG1 (*Friend of GATA1*) par l'intermédiaire de son doigt de zinc N-terminal, tout en interagissant avec l'ADN par le biais du doigt de zinc C-terminal³⁵⁵. GATA1 possède également un domaine d'activation transcriptionnelle N-terminal, interagit avec de multiples facteurs de transcription, co-activateurs et co-répresseurs et peut subir de nombreuses modifications post-traductionnelles^{356,357}.

GATA1 est exprimé faiblement dans les progéniteurs myéloïdes communs (CMP), mais subit une forte régulation positive dans les progéniteurs mégacaryocytes-érythroïdes (MEP) et les érythroblastes. Ce facteur de transcription active un ensemble de gènes érythroïdes précoces, tels que le récepteur de l'érythropoïétine au début de l'érythropoïèse, ce qui permet de favoriser la prolifération et la différenciation des cellules érythroïdes immatures. Tout au long de la maturation de ces cellules, GATA1 induit également l'expression des gènes érythroïdes de stade tardif, tels que ceux qui codent l'hémoglobine et les protéines impliquées dans la biosynthèse de l'hème³⁴⁷.

À partir du stade d'érythroblaste tardif, l'expression de GATA1 diminue, ce qui promeut la maturation des globules rouges (GR)³⁵⁸.

Situé sur le chromosome X, sa délétion chez les souris mâles entraîne la mort à E11.5 (jour embryonnaire 11.5) par anémie sévère³⁵⁹.

III.1.1.2. TAL1/SLC

Le facteur de transcription TAL1 (*T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1*) également connue sous le nom de SCL (*stem cell leukemia*) a été découvert grâce à son implication dans les événements de translocation associés à la formation de la leucémie lymphoblastique aiguë à cellules T. TAL1 appartient à la famille des facteurs de transcription bHLH (*basic helix-loop-helix*) caractérisés par un domaine d'interaction protéique HLH de 50 résidus, précédé d'une région de 10 résidus capable de fixer l'ADN³⁶⁰. TAL1 forme des hétérodimères en interagissant avec des facteurs à motif bHLH ubiquitaires, tels que les protéines E2a (E12 et E47), avant de se lier à l'ADN préférentiellement au niveau des séquences consensus E-box (CAGNTG) dans les cellules érythroïdes³⁵¹.

De plus, TAL1 est un régulateur crucial de l'hématopoïèse précoce. L'inactivation de *TAL1* par perte de fonction complète (« null ») dans des embryons de souris homozygotes entraîne un défaut d'hématopoïèse suivi de leur mort précoce au jour 9,5 du développement embryonnaire³⁶¹.

Il a été démontré dans des modèles de souris adultes *TAL1*-null, que les CSH étaient capables de survivre grâce à la redondance fonctionnelle assurée par LYL1, protéine bHLH apparentée, qui est impliquée à la fois dans la formation et la maintenance des CSH³⁶². Cependant, plusieurs études indiquent que l'absence de TAL1 s'accompagne de nombreux déficits dans le développement érythroïde et mégacaryocytaire^{349,363}. En effet, selon Kassouf et al., TAL1 est nécessaire à la différenciation érythroïde terminale. L'expression de la majorité des cibles génomiques de ce facteur de transcription nécessite une activité directe de liaison à l'ADN. L'analyse du recrutement de GATA1, protéine partenaire de TAL1, au niveau des séquences occupées par TAL1 suggère par ailleurs que la liaison de TAL1 se produit avant ou en même temps que celle de GATA1³⁵¹.

III.1.1.3. *KLF1/EKLF*

Le facteur érythroïde de type Kruppel (EKLF ou KLF1) est le membre fondateur de la famille des protéines KLF, qui comprend 17 facteurs de transcription différents fonctionnant dans divers tissus et jouant de nombreux rôles biologiques essentiels^{364,365}.

Il a été démontré KLF1 est capable de se lier aux boîtes CACC ou aux motifs riches en GC par l'intermédiaire de 3 doigts de zinc C2H2 de type SP1 C-terminal. Les motifs CACC sont des éléments promoteurs proximaux communément retrouvés dans de nombreux gènes érythroïdes, tels que les gènes de la β -globine et de la α -globine de l'homme et de la souris³⁶⁶⁻³⁶⁸. KLF1 joue deux rôles dans l'hématopoïèse: ce facteur réprime d'une part le démarrage de la mégacaryopoïèse et stimule l'expression des gènes érythroïdes d'autre part. Contrairement aux gènes dont la présence est requise pour l'établissement des deux lignées, *KLF1* est régulé négativement dans les mégacaryocytes après la formation du progéniteur mégacaryocyte-érythroïde³⁶⁹.

KLF1 agit principalement comme un activateur transcriptionnel qui joue un rôle global essentiel dans l'érythropoïèse primitive et définitive. Il assure le maintien de l'intégrité de la membrane du globule rouge ainsi que du cytosquelette et participe au contrôle de l'expression de nombreux gènes dont ceux codant l'AHSP et la β -globine ainsi que les enzymes de synthèse et de transport de l'hème, qui fonctionnent ensemble dans la production de la molécule

d'hémoglobine³⁷⁰.

Il a été démontré que KLF1 coopère avec les facteurs de transcription GATA1, TAL1 et le coactivateur EP300 au niveau d'un module cis-régulateur qui coordonne l'expression d'un ensemble de gènes érythroïdes³⁵².

L'ablation du gène *KLF1* a pour effet d'induire une β -thalassémie profonde entraînant la mort des embryons murins au moment du passage à l'expression de la β -globine adulte^{350,371}. Plus précisément, chez les souris *Klf1*^{-/-} la perturbation du programme d'expression des gènes apoptotiques n'entraîne pas d'apoptose mais conduit à un échec de la différenciation érythroïde terminale³⁵².

Enfin, KLF1 peut fonctionner comme un répresseur de transcription, probablement par le recrutement de corépresseurs tels que Sin3A³⁷².

III.1.2. GATA2

GATA2 est un facteur de transcription qui joue un rôle essentiel dans l'émergence et le maintien des cellules souches hématopoïétiques (CSH) ainsi que dans la spécification des progéniteurs érythroïdes précoces. Les doigts de zinc de GATA2 et GATA1 partagent un haut degré de similarité et se lient tous deux à un motif ADN consensus GATA³⁷³.

Chez la souris, GATA2 peut partiellement restaurer l'érythropoïèse primitive en l'absence de GATA1³⁷⁴. GATA1 et GATA2 sont impliqués dans une boucle de régulation clé pendant l'érythropoïèse, appelée « commutation des facteurs GATA (*Gata-switch*) ». Dans les progéniteurs hématopoïétiques, GATA2 auto-active son expression et transactive l'expression de GATA1. Au cours de l'engagement érythroïde, GATA1 auto-active également son expression. Le niveau accru de GATA1 conduit au déplacement de GATA2 de ses multiples sites de liaison au gène *GATA2* et supprime son expression. Ainsi, le « switch » des facteurs GATA déclenche la différenciation érythroïde^{375,376} (Figure 22).

III.1.3. Les complexes LDB1 dans la transcription des gènes érythroïdes

Dans l'activation des gènes érythroïdes, GATA1, TAL1 et KLF1 opèrent de manière synergique au sein de structures protéiques d'ordre supérieur appelés « complexes LDB1 » qui incluent les adaptateurs nucléaires LDB1 (*LIM domain binding proteins 1*) et LMO2 (*LIM domain only 2*)^{347,377}.

La protéine LDB1 peut se dimériser grâce à son domaine d'auto-association, ce qui facilite la formation d'une boucle d'ADN et la juxtaposition de plusieurs complexes LDB1. Il a été suggéré

que cette propriété de LDB1 facilite les interactions à longue distance telles que la juxtaposition des éléments amplificateurs et des promoteurs érythroïdes ou encore le recrutement des gènes érythroïdes au niveau des interactomes transcriptionnels situés près des gènes *HBA* et *HBB*³⁴⁷. Une cartographie à l'échelle du génome des sites de liaison du complexe LDB1 a révélé que ces derniers sont fréquemment colocalisés avec les sites de liaison de KLF1 et avec les motifs de liaison consensus d'autres facteurs de transcription érythroïdes. Une analyse transcriptomique a du reste démontré une forte corrélation entre la liaison du complexe LDB1 et l'expression des gènes et a identifié un grand nombre de gènes corégulés par les complexes LDB1 et KLF1³⁷⁸. LMO2 est une petite protéine composée de deux domaines LIM. LMO2 se lie au doigt de zinc N-terminal de GATA1, ce qui permet la formation d'un pont entre TAL1/E2A et GATA1³⁷⁹. Dans les CSH, GATA2 intervient également en grande partie au sein des complexes LDB1 dans le contrôle de l'expression des gènes impliqués dans le maintien des CSH³⁸⁰. À la suite du switch GATA survenant au cours de l'érythropoïèse, GATA1 est incorporé dans le complexe LDB1, ce qui favorise l'engagement vers la voie érythroïde³⁴⁷ (Figure 22).

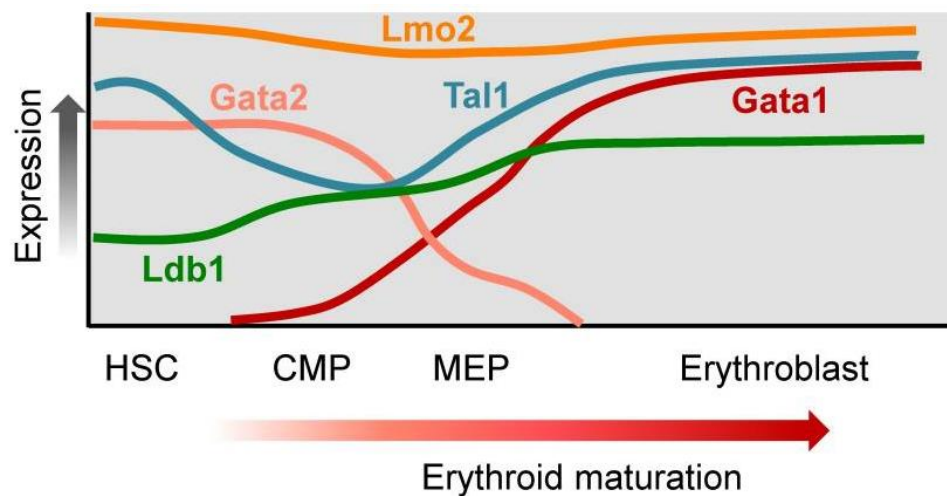


Figure 22. Expression des composants du complexe LDB1 au cours de la différenciation érythroïde à partir des cellules progénitrices hématopoïétiques.

Dans les cellules progénitrices les plus précoces, l'expression de GATA2 est élevée tandis que celle de GATA1 est faible, mais lorsque les cellules se dirigent vers la lignée érythroïde, l'expression de GATA1 est induite tandis que celle de GATA2 est réprimée (D'après Love et al., 2014³⁴⁷).

III.2. Régulation traductionnelle de l'érythropoïèse

En raison de l'absence de transcription active dans les réticulocytes et de traduction dans les cellules matures, la régulation fine de la traduction est essentielle au maintien d'une synthèse protéique suffisante pour assurer le fonctionnement physiologique ainsi que la différenciation des cellules érythroïdes. Aussi, des perturbations de la machinerie traductionnelle ou de l'homéostasie ribosomale peuvent induire la survenue d'une anémie³⁸¹.

Dans ce travail, nous décrivons quelques mécanismes importants de contrôle de la traduction dans l'érythropoïèse, en nous intéressant particulièrement aux ribosomopathies, pathologies qui affectent sélectivement le processus de traduction dans la lignée érythroïde^{381,382}.

III.2.1. Régulation des ribosomes et ribosomopathies

Les mutations dans les gènes *RP* (*ribosomal protein*), ou toute anomalie génétique qui altère la biogenèse et la fonction du ribosome, entraînent des phénotypes cliniques spécifiques collectivement connus sous le nom de « ribosomopathies »^{381,382}. La lignée érythroïde est particulièrement sensible au dysfonctionnement du ribosome dans les ribosomopathies, comme en témoignent les troubles hématologiques que sont l'anémie de Diamond-Blackfan (DBA) et le syndrome 5q-, tous deux marqués par une hypoplasie érythroïde de la moelle osseuse. Première ribosomopathie identifiée, la DBA est provoquée par une ou plusieurs mutations hétérozygotes de perte de fonction survenant au niveau de l'un des 19 gènes *RP*, *RPS19* étant le gène le plus fréquemment muté dans la DBA (environ 25% des cas)^{383,384}. Le syndrome 5q est un sous-type du syndrome myélodysplasique (SMD) dans lequel la délétion somatique d'un allèle du chromosome 5q entraîne une haplo-insuffisance du gène *RPS14*³⁸⁵.

Plusieurs raisons ont été évoquées pour expliquer la sensibilité du processus érythropoïétique à la dérégulation traductionnelle. D'après Dutt et al., l'échec de l'érythropoïèse observé dans la DBA ou le syndrome 5q est associé à l'expression de p53, dont le seuil d'induction est bas dans la lignée érythroïde. Dans les cellules progénitrices érythroïdes, le knockdown partiel de *RPS14* (le gène de la protéine ribosomique supprimé dans le syndrome 5q) ou de *RPS19* (le gène le plus fréquemment muté dans la DBA) entraîne en effet une accumulation sélective de p53. L'hyperactivation de la voie p53 induit ensuite l'expression de p21, gène cible de p53, ainsi qu'un arrêt du cycle cellulaire et une apoptose, phénotypes spécifiques aux cellules érythroïdes et observés au cours du syndrome 5q et du DBA. L'inhibition pharmacologique de p53 permet

de corriger le défaut érythroïde. À l'inverse, le nutlin-3, un composé qui active p53 par l'inhibition de HDM2 (*human double minute 2*), régulateur négatif de p53, perturbe de manière sélective l'érythropoïèse³⁸⁶.

En outre, les déficiences ribosomiques peuvent entraîner une traduction défectueuse des ARNm ayant des fonctions essentielles dans l'érythropoïèse. Dans des lignées d'érythroblastes de souris I/11 déficiente en p53, le déficit en RPS19 ou de RPL11 a notamment supprimé la traduction des transcrits de *BAG1*, codant la cochaperonne de HSP70 et de *CSDE1*, codant une protéine de liaison à l'ARN, deux gènes habituellement fortement exprimés dans les érythroblastes³⁸⁷.

Par ailleurs, l'étude de Khajuria et al. souligne que c'est la quantité de ribosomes, et non leur composition, qui joue un rôle clé dans l'engagement des HSPC vers la lignée érythroïde. Plus précisément, il a été constaté dans cette étude qu'un déficit de traduction de plusieurs transcrits qui sont habituellement régulés positivement au cours des premiers stades de la spécification vers la lignée érythroïde à partir des HSPC joue un rôle clé dans les phénotypes *in vivo* observés chez DBA. La plupart de ces transcrits sensibles à l'haplo-insuffisance RP – y compris le transcrit ARNm de *GATA1* – ont pour particularités d'avoir des 5' UTR courts et non structurés alors que ces dernières caractéristiques sont associées à une efficacité de traduction accrue dans les conditions de base. En outre, il est intéressant de noter que parmi un groupe de 36 régulateurs maîtres hématopoïétiques analysés qui jouent un rôle bien défini dans l'engagement de lignée, la majorité avait des 5' UTR significativement plus longs et plus complexes par rapport aux transcrits sensibles aux niveaux réduits de ribosomes. Seul, l'ARNm de *GATA1* fait donc figure d'exception, alors que le gène *GATA1* est lui-même un régulateur maître bien connu de l'érythropoïèse. Aussi, les caractéristiques 5' UTR de *GATA1* uniques par rapport à celles des autres régulateurs maîtres analysés, pourrait expliquer sa sensibilité traductionnelle à des niveaux réduits de ribosomes et le défaut spécifique de lignée qui en découle, observé dans la DBA³⁸⁸.

Plus récemment, l'équipe de Boussaid et al. a montré que la longueur de la séquence codante (CDS ou *CoDing Sequence*) du transcrit ARN, le biais d'utilisation des codons et la structure du 3'UTR sont des facteurs clés qui déterminent la sélectivité de traduction, dans des conditions de disponibilité limitée en ribosomes. Le CAI (*Codon Adaptation Index*) est un paramètre qui mesure le biais d'utilisation des codons synonymes pour une séquence d'ADN ou d'ARN. L'indice varie de 0 à 1 : il est de 1 si le transcrit utilise toujours les codons synonymes les plus fréquemment associés à une élongation plus rapide de la traduction^{389,390}. Au cours de la

différenciation érythroïde normale, les transcrits ARN correspondant aux protéines les plus exprimées ont un CAI élevé, une longueur de transcription courte et des extrémités UTR 5' et 3' non structurées. Dans des cellules déficientes en RPS14 mimant les défauts érythroïdes du syndrome 5q-, la régulation négative de RPS14 réduit la disponibilité intracytoplasmique en ribosomes, ce qui conduit à une traduction sélective aux dépens de GATA1 et d'autres gènes érythroïdes tels que ceux exprimant les hémoglobines. Plus précisément, ce sont les transcrits ARN courts avec une 3'UTR très structurée et un CAI élevé qui présentent alors une efficacité de traduction réduite. Dans ce contexte, Boussaid et al. suggèrent que l'altération de la maturation érythroïde due au syndrome 5q- peut provenir d'une sélectivité de traduction se produisant au détriment du programme de différenciation érythroïde, et que le défaut traductionnel de GATA1 peut être expliqué à partir d'éléments caractéristiques situés sur la séquence codante et sur l'UTR du transcrit ARN³⁹⁰.

Dans certains cas de DBA, les niveaux de GATA1 peuvent être indirectement affectés par les déficiences ribosomales. Plus précisément, une dégradation protéasomale anormale de la chaperonne HSP70 dans les progéniteurs érythroïdes a été détectée dans les cellules érythroïdes humaines primaires haploinsuffisantes RPL5 ou RPL11, mais pas dans les cellules progénitrices haploinsuffisantes RPS19. La dégradation protéasomale de HSP70 entraîne le clivage de GATA1, la diminution des progéniteurs érythroïdes et l'apoptose dans le phénotype sévère de la DBA³⁹¹. Il est à noter que la chaperonne HSP70 intervient dans la protection de GATA1 contre le clivage par la caspase-3 activé au sein des précurseurs érythroïdes, les empêchant ainsi d'entrer en apoptose. Par conséquent, HSP70 joue à la fois un rôle en phase précoce de prolifération et au cours de la différenciation érythroïde terminale²⁷².

III.2.2. Rôle des protéines de liaison à l'ARN dans la régulation de l'initiation de la traduction

Les protéines de liaison à l'ARN (RBP pour *RNA Binding Proteins*) sont des composants essentiels de la machinerie traductionnelle, qui interviennent généralement dans la traduction des ARNm, en identifiant des motifs particuliers situés dans les UTR 5' et 3'^{381,392}. Les RBP jouent un rôle important dans le contrôle de la traduction dans l'érythropoïèse. Par exemple, il a été constaté dans un modèle murin que la protéine de liaison à l'ARNm CPEB4 est fortement induite au cours de la différenciation érythroïde terminale par les facteurs de transcription GATA1 et TAL1, essentiels à l'érythropoïèse terminale. En interagissant avec le facteur d'initiation de la traduction eIF3, CPEB4 réprime la traduction d'un grand nombre d'ARNm,

qui sont pour la plupart connus pour être régulés négativement au cours du développement érythroïde terminal. Cpeb4 se lie également à son propre ARNm de manière à réprimer sa traduction et l'expression ectopique de CPEB4 bloque la différenciation érythroïde. Ainsi, selon Hu et al., l'induction transcriptionnelle et la répression traductionnelle se combinent de manière à former une boucle de rétroaction négative qui restreint les niveaux de CPEB4 au sein d'un intervalle de concentration spécifique requis pour l'érythropoïèse terminale³⁹³.

RBM38 est une autre RBP qui est spécifiquement induite dans les érythroblastes en fin de différenciation par GATA1/TAL1. Elle a été en particulier associée à l'épissage pendant l'érythropoïèse tardive. En interagissant avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4G, RBM38 favorise la traduction de certains ARNm au sein des cellules en différenciation terminale et au cours de l'énucléation, alors que les niveaux d'expression des ARN diminuent. L'inhibition de RBM38 entraîne un défaut de traduction et bloque la génération de réticulocytes, ce qui plaide en faveur d'un rôle critique de RBM38 pendant l'érythropoïèse³⁹⁴.

III.2.3. Recyclage des ribosomes et homéostasie ribosomale

Des travaux ont montré que la régulation dynamique du recyclage des ribosomes intervient dans le maintien de l'homéostasie ribosomale dans les cellules érythroïdes. Au cours de la différenciation érythroïde terminale, il se produit en effet une perte naturelle du recyclage des ribosomes médié par ABCE1 (*ATP-binding cassette sub-family E member 1*), ce qui entraîne l'entrée de ribosomes vacants, non recyclés, dans l'UTR 3' des ARNm des réticulocytes. Ces fragments 3'UTR peuvent être libérés par la surexpression des facteurs de sauvetage des ribosomes PELO et HBS1L, ce qui suggère qu'une régulation positive de PELO/HBS1L serait essentielle au maintien du pool de ribosomes disponibles pour la traduction, lorsque l'activité d'ABCE1 diminue au cours de la différenciation des cellules sanguines anucléées³⁹⁵.

III.3. Biosynthèse de l'hème et régulation de l'équilibre de synthèse entre l'hème et l'hémoglobine

III.3.1. Biosynthèse de l'hème

L'hémoglobine humaine est une métalloprotéine formée par l'appariement symétrique d'un dimère de chaînes polypeptidiques alpha (globine α) et bêta (globine β), en une unité structurale et fonctionnelle tétramérique. Chacune des chaînes a une conformation spatiale lui donnant une forme globulaire et constituant une « poche » dans laquelle est logée la molécule d'hème capable de fixer l'oxygène. $\alpha_2\beta_2$ représente la principale hémoglobine adulte³⁹⁶. L'hème, groupement prosthétique de l'hémoglobine, est constitué d'un noyau tétrapyrrolique associé à un atome de fer. Sa synthèse dans les cellules érythroïdes est finement coordonnée avec celles des globines. Un déséquilibre dans la synthèse de l'un ou de l'autre de ces composés a des conséquences négatives pour la cellule. En effet, les chaînes de globines dépourvues d'hème sont non fonctionnelles et s'agrègent tandis que l'hème à l'état libre est hautement toxique³⁹⁷.

L'hème est synthétisé au sein des progéniteurs érythroïdes en développement, au stade de proérythroblaste, à travers une série de huit réactions enzymatiques réparties entre la mitochondrie et le cytosol³⁹⁸. La première étape a lieu dans la matrice mitochondriale et implique la condensation de la glycine avec le succinyl-coenzyme A, réaction catalysée par l'acide δ -aminolévulinique synthase 2 (ALAS2) dans les cellules érythroïdes. Le composé intermédiaire formé, l'acide δ -aminolévulinique (ALA), est ensuite exporté vers le cytosol où il est converti, par quatre réactions enzymatiques successives, en coproporphyrinogène III (CPgenIII). Le CPgenIII est ensuite retransporté vers l'espace intermembranaire mitochondrial et converti en protoporphyrine IX (PPIX) par deux enzymes. Enfin, la ferrochélatase (FECH) catalyse l'insertion du fer ferreux (Fe^{2+}) dans la PPIX, ce qui aboutit à la formation de l'hème³⁹⁷⁻³⁹⁹. Par conséquent, une régulation étroite de la disponibilité de l'hème et de ses précurseurs au sein de l'espace intermembranaire et de la matrice mitochondriale est indispensable à la biosynthèse du groupement prosthétique héminique, ainsi qu'à l'assemblage des hémoprotéines³⁹⁷.

Les défauts de synthèse de l'hème dans la lignée érythroïde entraînent des anémies sidéroblastiques, caractérisées par une anémie microcytaire associée à une surcharge mitochondriale en fer, ou des porphyries érythropoïétiques, caractérisées par un dépôt de porphyrine dans les cellules érythroïdes³⁹⁸. Chez les patients souffrant de protoporphyrine

érythropoïétique, des mutations au sein des gènes *ALAS2* et *FECH*, qui codent deux enzymes ayant un rôle limitant dans la vitesse de biosynthèse de l'hème, produisent une carence en hème dans le compartiment érythroïde. Ce déficit en hème est à l'origine de la survenue d'une anémie sidéroblastique ou hypochrome et microcytaire^{398,400-403}.

Par ailleurs, l'exécution de plusieurs étapes de la synthèse de l'hème repose sur la biogénèse des clusters fer-soufre (Fe-S), notamment lorsque de grandes quantités d'hème sont sollicitées pour l'hémoglobination au cours de l'érythropoïèse. Dans des modèles de poisson zèbre, la déficience de plusieurs protéines impliquées dans la biosynthèse des clusters Fe-S telles que *GLRX5*, *ISCA* et *C1orf69* provoque une anémie. Il est à noter que toutes ces protéines sont fortement exprimées dans les tissus érythroïdes et sont induites au cours de la différenciation érythroïde⁴⁰⁴⁻⁴⁰⁶. *ABCB7* est un transporteur à cassettes liant l'ATP qui intervient dans l'export de métabolites issus des mitochondries et nécessaires à l'assemblage cytosolique des clusters Fe-S⁴⁰⁷. Des mutations hémizygotiques faux-sens ou de perte de fonction partielle d'*ABCB7* provoquent une forme syndromique rare d'anémie sidéroblastique congénitale microcytaire liée à l'X et associée à une ataxie cérébelleuse (*XLSA/A*)⁴⁰⁸⁻⁴¹¹.

III.3.2. Rôles régulateurs de l'hème sur la synthèse des chaînes de globine

Au cours de la différenciation érythroïde, la synthèse de l'hème précède et est essentielle à la synthèse des chaînes de globine. Ce processus en deux temps est en partie expliqué par le rôle régulateur de l'hème sur la transcription des gènes de globines α et β ainsi sur que leur traduction, contrôle qui permet d'assurer une synthèse équilibrée de tous les constituants de l'hémoglobine.

En effet, dans les progéniteurs érythroïdes précoces, la transcription des gènes de globines α et β est inhibée par le répresseur transcriptionnel *BACH1*. *BACH1* antagonise l'activité des facteurs de transcription *sMaf* qui se lient aux séquences *MARE* (*Maf recognition element*) situées dans la région régulatrice des gènes de la globine. Lorsque la biosynthèse de l'hème débute au sein des progéniteurs érythroïdes tardifs, l'hème se lie à *BACH1* dans le noyau, déclenche sa translocation vers le cytosol et induit son ubiquitinylation ainsi que sa dégradation⁴¹². De plus, l'hème stabilise le facteur de transcription *NRF2* qui s'accumule dans le noyau. Associé aux protéines *sMaf*, *NRF2* active la transcription des chaînes de globine^{398,413}.

La traduction des chaînes de globine α et β dans les progéniteurs érythroïdes dépend de la protéine HRI (*heme-regulated inhibitor*), qui est capable de détecter le niveau d'hème intracellulaire. HRI est un membre d'une famille de protéines kinases capable de phosphoryler la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eucaryote eIF2 α (*eukaryotic translation initiation factor 2 α*). En l'absence d'une quantité suffisante d'hème cellulaire, le facteur HRI est activé, ce qui induit la phosphorylation d'eIF2 α et subséquemment l'inhibition de la synthèse protéique, en particulier celle des protéines de la globine. Inversement, lorsque l'hème se lie à HRI, celle-ci est inactivée et eIF2 α n'est pas phosphorylé, ce qui permet la synthèse des protéines. Ainsi, seulement après l'initiation de la biosynthèse de l'hème dans les progéniteurs érythroïdes en différenciation, l'inhibition de l'activité de HRI permet la synthèse des globines α et β . Par conséquent, HRI joue un rôle fondamental en veillant à ce qu'aucune globine ne soit synthétisée en excès par rapport à la quantité qui peut être assemblée en tétramères d'hémoglobine^{397,398}.

La régulation par HRI de l'équilibre entre la synthèse des globines α et β et la disponibilité de l'hème dans les précurseurs des GR est nécessaire à la survie des précurseurs érythroïdes. Chez les souris HRI^{-/-} déficientes en fer, les globines dépourvues d'hème s'agrègent dans les GR et leurs précurseurs, ce qui entraîne une anémie normocytaire hyperchrome avec une diminution du nombre de GR, une hyperplasie érythroïde compensatoire et une apoptose accélérée dans la moelle osseuse et la rate⁴¹⁴.

HRI joue un rôle protecteur dans des modèles murins de maladies héréditaires des GR : La déficience en HRI exacerbe la protoporphyrie érythropoïétique et rend la bêta-thalassémie létale chez l'embryon⁴¹⁵. En cas de stress du réticulum endoplasmique et de privation de nutriments, la phosphorylation d'eIF2 α médiée par HRI induit la voie de signalisation d'ATF4, facteur de transcription impliqué dans l'induction d'un programme d'expression de gènes cibles connu sous le nom de réponse intégrée au stress (ISR, *integrated stress response*)⁴¹⁶. Cette voie eIF2 α P-ATF4 dépendante de HRI promeut la différenciation érythroïde dans des conditions de stress. L'équipe de Suragani et al. a montré qu'il était possible de traiter un modèle murin de β -thalassémie en favorisant l'axe HRI-eIF2 α P-ATF4 à l'aide du salubrinal, un inhibiteur chimique de la déphosphorylation d'eIF2 α P⁴¹⁷. Fait intéressant, d'autres études ont rapporté que le salubrinal augmente les niveaux d'eIF2 α P ainsi que la production d'HbF en favorisant la traduction de l'ARNm de la globine γ dans des progéniteurs érythroïdes humains. HRI pourrait donc être impliquée dans la synthèse de la globine γ ^{418,419}. En outre, la voie HRI-eIF2 α P-ATF4

est capable d'exercer un rétrocontrôle négatif sur l'érythropoïèse stimulée par l'EPO dans des conditions de carence en fer/hème, en réprimant la signalisation du complexe mTORC1 (*mechanistic target of rapamycin*), en particulier dans la lignée érythroïde. Ainsi, l'hème et la traduction régulent l'érythropoïèse par le biais de 2 voies de signalisation clés, ISR et mTORC1, qui sont coordonnées par HRI de manière à compenser une érythropoïèse inefficace⁴²⁰.

III.3.3. HSP70 dans la balance hème/globine

Dans les cellules érythroïdes de la DBA, les travaux de Rio et al. ont démontré que la synthèse déséquilibrée de la globine et de l'hème est responsable de l'excès d'hème libre et des effets délétères qui en découlent sur l'érythropoïèse, ce déséquilibre étant plus marqué chez les patients DBA porteurs des mutations dans *RPL5* et *RPL11*, des gènes *RP* différents de *RPS19*. Plus important, l'étude rapporte que HSP70 joue un rôle majeur dans le contrôle de l'équilibre de la synthèse hème/globine. En effet, HSP70, en tant que chaperonne de GATA1, contrôle l'expression de ce régulateur maître de l'érythropoïèse ainsi que celle de ses cibles, telles que les chaînes de globine, l'hème ou les protéines impliquées dans le métabolisme de l'hème, comme HRI et δ -aminolevulinate synthase 2 (*ALAS2*). Selon Rio et al., le déséquilibre hème/globine peut être expliqué par la diminution des niveaux de HSP70 et de GATA1 observée dans les érythroblastes de la DBA. La ré-expression de HSP70 permet de restaurer les niveaux de GATA1, d'augmenter la synthèse de globine, réduisant ainsi l'excès d'hème libre et l'apoptose des cellules érythroïdes de la DBA. HSP70 permet ainsi d'expliquer le défaut intrinsèque de la DBA par le contrôle qu'elle exerce sur la différenciation et la survie érythroïde via GATA1, ainsi que sur l'excès d'hème libre, résultant du déséquilibre hème/globine⁴²¹.

III.4. Régulations réciproques entre le fer et l'érythropoïèse

III.4.1. Absorption, cycle et distribution du fer dans l'organisme

Les principales sources de fer plasmatique sont les entérocytes et les macrophages^{422,423} (Figure 23). L'absorption du fer se produit dans l'intestin, la plus grande partie de l'absorption ayant lieu dans le duodénum. Après conversion du fer de sa forme ferrique (Fe^{3+}) à sa forme ferreuse (Fe^{2+}) par un processus de réduction impliquant la *CYBDR1* (*cytochrome b réductase 1*) duodénale, également appelée *DCYTB* (*duodenal cytochrome b*), ou bien d'autres enzymes⁴²⁴,

le fer non héminique est absorbé par le transporteur de cations divalents 1 (DMT1) situé au niveau de la surface apicale des entérocytes⁴²⁵. Le fer pourrait également se lier à des protéines contenant de l'hème, comme l'hémoglobine, auquel cas l'hème-Fe est absorbé par le transporteur de folate couplé aux protons SLC46A1 (*Solute Carrier Family 46 Member 1*) également connu sous le nom de HCP1 (*Heme Carrier Protein 1*)⁴²⁶. Les macrophages captent le fer par érythrophagocytose, processus par lequel les GR sénescents sont dégradés, ce qui permet le recyclage du fer qu'ils contiennent⁴²⁷.

La libération du Fe²⁺ dans le plasma à partir des entérocytes et des macrophages s'effectue par la ferroportine (FPN), encore appelée SLC40A1 (*Solute Carrier family 40 member 1*), exporteur de fer fortement exprimé au niveau de la membrane plasmique des entérocytes et également retrouvé sur celle des macrophages⁴²⁸.

Le Fe²⁺ exporté est ensuite oxydé en Fe³⁺ par la céruloplasmine (CP) circulante et l'héphaestine ancrée à la membrane des entérocytes, avant de se lier à la transferrine, ce qui conduit à la formation de l'holotransferrine^{429,430}.

L'holotransferrine distribue ensuite le fer à tous les types cellulaires et en particulier aux érythroblastes qui en sont les principaux consommateurs. Les niveaux d'holotransferrine sont également détectés par les hépatocytes qui absorbent le fer par le biais du TFR1⁴³¹. Il est à noter qu'une toxicité cellulaire induite par le fer peut survenir en cas d'excès de fer non lié à la transferrine⁴²³.

En réponse à des niveaux élevés d'holotransferrine, l'hepcidine, peptide produit par les hépatocytes est sécrété dans le plasma et induit la dégradation de la FPN, ce qui permet de réguler l'exportation du fer à partir des entérocytes et des macrophages. En revanche, lorsque le taux de fer sérique est bas, le taux d'hepcidine diminue, ce qui permet de réduire la dégradation de la FPN et donc l'export du Fe²⁺ vers la circulation générale rétablissant ainsi un taux de fer adéquat. Le contrôle du niveau d'expression de l'hepcidine représente donc un facteur majeur dans le contrôle de l'homéostasie systémique du fer^{432,433}.

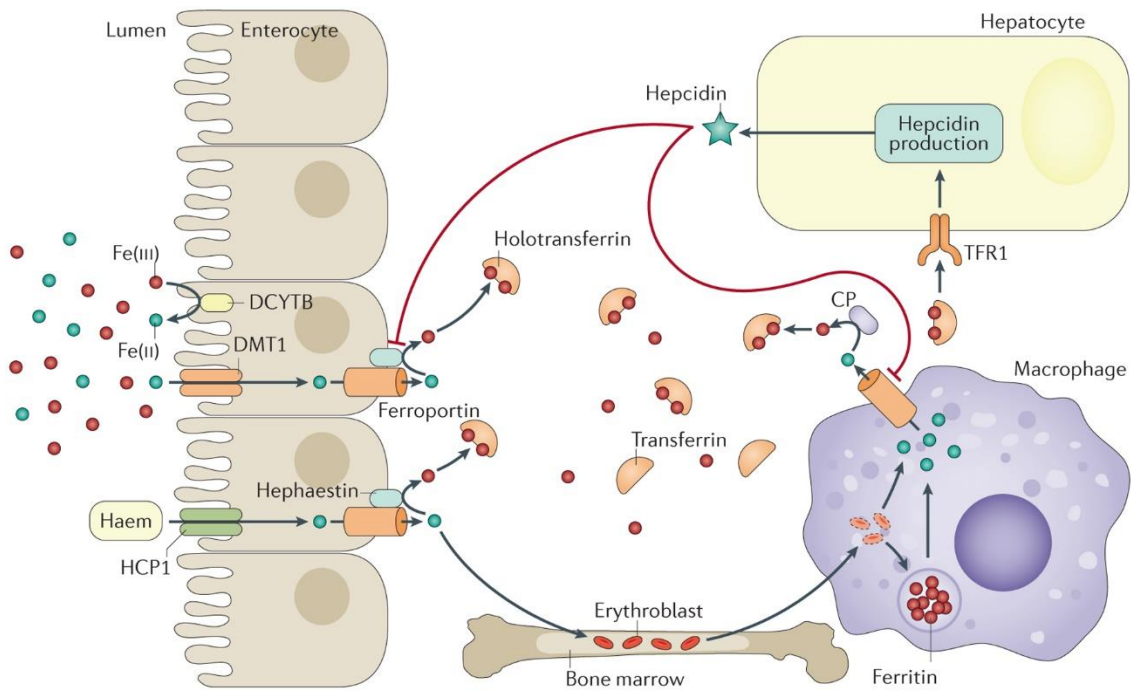


Figure 23. Absorption, cycle et distribution du fer dans l'organisme (D'après Brissot et al., 2018⁴²³).

III.4.2. Absorption et métabolisme du fer dans l'érythroblaste

La transferrine sérique est la principale source de fer des érythroblastes en développement. Celle-ci sort du plasma et se lie aux récepteurs de la transferrine avant d'être internalisée au sein de l'érythroblaste, où elle libère le fer dans des vésicules endosomales acides. Dans l'îlot érythroblastique, les cellules érythroïdes en développement entourent un macrophage central, appelé macrophage nourricier. Ce dernier pourrait apporter du fer aux érythroblastes. En effet, une sécrétion de ferritine a été observée au niveau de l'espace situé entre les macrophages nourriciers et les érythroblastes. Des études indiquent que cette ferritine peut être absorbée par les érythroblastes par micropinocytose⁴³⁴. De plus, il a été postulé que l'hème pourrait être directement transféré aux érythroblastes via des transporteurs d'hème tels que HRG1 et FLVCR1 qui seraient exprimés à la surface de la membrane plasmique des érythroblastes et des macrophages^{435,436}. Le fer libéré de la transferrine après acidification de l'endosome peut ensuite être utilisé par la cellule, stocké avec la ferritine ou exporté^{437,438} (Figure 24).

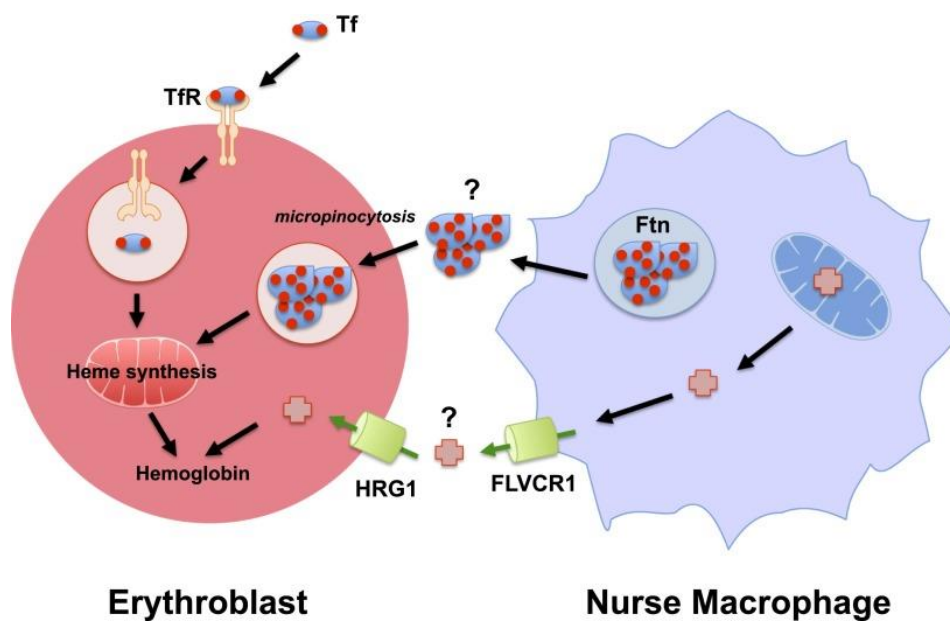


Figure 24. Absorption du fer dans l'érythroblaste en développement (D'après Korolnek et al., 2015⁴³⁵).

III.4.3. Régulation du fer par les érythroblastes

L'érythroferrone (ERFE) est une hormone régulatrice essentielle du métabolisme du fer, qui intervient dans la suppression précoce de l'hepcidine au cours d'une érythropoïèse de stress (survenant par exemple à la suite d'une hémorragie). En réponse à l'EPO, l'expression d'ERFE par les érythroblastes en cours de différenciation dans la moelle osseuse et la rate augmente rapidement d'une manière dépendante de la voie EPO-STAT5. Sécrétée dans la circulation, ERFE agit directement sur le foie et induit la répression de l'hepcidine. La suppression de l'hepcidine médiée par ERFE augmente à son tour la disponibilité du fer et permet ainsi la synthèse de nouveaux GR.

Les souris déficientes en ERFE ne parviennent pas à supprimer rapidement l'hepcidine après une hémorragie et présentent un retard de reconstitution érythropoïétique. Dans un modèle de thalassémie intermédiaire murine *Hbb^{Th3/+}*, l'expression fortement augmentée d'ERFE contribue à la suppression de l'hepcidine et à la surcharge en fer systémique caractéristique de cette maladie⁴³⁹.

Il a été également suggéré que GDF15 (*Growth/differentiation factor 15*) et TWSG1 (*Twisted gastrulation protein homolog 1*), deux membres de la famille des protéines morphogénétiques osseuses se comportaient comme des suppresseurs pathologiques de l'hepcidine dans la thalassémie^{440,441}. Cependant, il n'existe pas de preuves définitives qui concernent le rôle

pathogène de ces médiateurs dans les anémies ferriprives et des études récentes s'opposent à l'hypothèse de leur contribution dans la suppression physiologique de l'hepcidine survenant après une hémorragie⁴⁴¹⁻⁴⁴³.

Par ailleurs, la ferroportine (FPN) des cellules érythroïdes est capable de rejeter une quantité importante de fer dans le sang, ce qui lui permet de jouer un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie systémique du fer, en particulier dans des conditions de carence en fer, et dans la protection des globules rouges contre le stress oxydatif. La carence en FPN prédispose les globules rouges aux lésions oxydatives. Ainsi, des souris knockout spécifique de la FPN des érythrocytes (FPN KO) ont développé une anémie hémolytique exacerbée par le stress oxydatif à la suite d'une surcharge en fer érythrocytaire et des lésions oxydatives qui en découlent⁴⁴⁴.

III.4.4. Régulation de l'érythropoïèse par le taux de fer sérique

Les protéines régulatrices du fer 1 et 2 (IRP ou *iron regulatory protein*) contrôlent de manière post-transcriptionnelle l'expression des transcrits qui contiennent des séquences d'éléments de réponse au fer (IRE), notamment la ferritine, la ferroportine, le récepteur de la transferrine et le facteur HIF2 α (*Hypoxia inducible 2 α*), en réponse au taux de fer circulant^{438,445-447}.

IRP1 est un régulateur clé de la traduction de l'ARNm de HIF2 α et des réponses physiologiques dépendantes de HIF2 α chez la souris. Les souris IRP1^{-/-} présentent une dérégulation transcriptionnelle de l'ARNm de HIF2 α qui entraîne le développement d'une polyglobulie en raison d'une expression accrue de l'EPO, cible transcriptionnelle connue de HIF2 α . L'augmentation des taux d'EPO circulante chez les souris IRP1^{-/-} entraîne également une suppression de l'ARNm de l'hepcidine hépatique, processus qui favorise à son tour l'hyperferrémie et la déplétion en fer dans les macrophages spléniques en raison de l'expression non restreinte de la ferroportine^{445,448-450}.

D'après Wilkinson et al., IRP1 fonctionnerait comme un capteur d'oxygène et de fer dans les tissus. Dans des conditions normoxiques, IRP1 présente sous une forme liée à l'APO se fixe sur une séquence IRE en 5' de l'ARNm de HIF2 α de manière à bloquer sa traduction, ce qui maintient les concentrations de HIF2 α et d'EPO à un niveau bas. L'hypoxie ou l'augmentation de l'apport en fer favorisent la conversion de l'APO en [4Fe-4S]-IRP1, qui agit comme une aconitase cytosolique et ne se lie pas à l'ARNm de HIF2 α , permettant ainsi la synthèse de HIF2 α . Cette réponse stimulerait l'érythropoïèse à la suite de l'activation transcriptionnelle de l'EPO dépendante de HIF2 α , ce qui permettrait de répondre aux besoins des tissus en oxygène et de réduire le taux de fer sérique⁴⁴⁹.

Par ailleurs, la carence en fer induit l'inactivation de l'aconitase, l'hyperactivation de la protéine kinase C (PKC) et l'induction du facteur de transcription PU.1, ce qui entraîne la perturbation de la maturation érythroïde. Les effets de la carence en fer peuvent être révertés par un traitement à l'isocitrate, qui imite l'activité enzymatique de l'aconitase^{446,451}.

III.5. Rôle des cytokines EPO et SCF dans la régulation extrinsèque de l'érythropoïèse

L'érythropoïèse est contrôlée par deux cytokines majeures, l'érythropoïétine (EPO) et le facteur des cellules souches (SCF), et leurs récepteurs de signalisation respectifs, EPOR et c-KIT. EPOR et c-KIT sont essentiels au développement érythroïde. Les souris déficientes en l'un ou l'autre de ces récepteurs meurent *in utero* en raison d'une érythropoïèse hépatique fœtale altérée⁴⁵²⁻⁴⁵⁵. KIT est exprimé dans les CSPH et est régulé négativement lors de la différenciation des CFU-E⁴⁵⁶. EPOR est régulé positivement après l'engagement érythroïde et est exprimé jusqu'aux stades érythroblastiques les plus tardifs⁴⁵⁷. On considère généralement que c-KIT stimule la prolifération des progéniteurs au cours de l'érythropoïèse précoce, tandis que EPOR favorise la survie et la maturation à des stades ultérieurs, bien que leurs activités se chevauchent et qu'il existe des preuves de régulation croisée⁴⁵⁸⁻⁴⁶¹. En outre, c-KIT et EPOR déclenchent des voies de signalisation similaires, notamment JAK2 (Janus Kinase 2)/STAT5, RAS (*Rat sarcoma virus*)/RAF (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma)/MAPK et PI3K/AKT^{462,463}. Dans ce travail, nous développons les principales voies de signalisation médiées par les interactions EPO/EPOR et SCF/c-KIT et la manière dont ces interactions coopèrent dans la régulation de l'érythropoïèse.

III.5.1. Transduction du signal de l'érythropoïétine : principales voies de signalisation dépendantes de l'interaction EPO/EPOR dans l'érythropoïèse

III.5.1.1. Activation du récepteur à l'érythropoïétine et de la tyrosine kinase JAK2 induite par EPO/EPOR
Le récepteur à l'EPO (EPOR) est présent principalement à la surface des CFU-E dans la moelle osseuse (environ 1000 molécules EPOR/cellule). En revanche, les réticulocytes et les érythrocytes matures ne possèdent pas d'EPOR⁴⁶⁴. L'EPOR existe sous la forme d'un homodimère même en l'absence de ligand, chaque dimère étant composé d'un domaine extracellulaire et d'un domaine intracellulaire ancrés dans la membrane cellulaire⁴⁶⁵. Le domaine extracellulaire est responsable de la fixation de l'EPO : il comporte deux paires de

résidus cystéine conservés et un motif appelé WSXWS, qui représente la séquence d'acides aminés tryptophane-sérine-X (acide aminé quelconque)-tryptophane-sérine. Le domaine intracellulaire est responsable de la signalisation intracellulaire^{464,466}.

Bien que l'EPOR soit un membre de la superfamille des récepteurs de cytokines et ne possède pas de domaine kinase, l'interaction EPO/EPOR induit une réponse biologique par l'intermédiaire de la JAK2, protéine à tyrosine kinase⁴⁶⁷. Il a été suggéré que JAK2 sous sa forme libre est maintenue dans un état inactif. En revanche, sous sa forme liée par son domaine FERM avec l'EPOR, JAK2 est activable⁴⁶⁸.

Lorsque l'EPO se lie à son récepteur dimérique EPOR situé sur les progéniteurs érythroïdes, le récepteur subit un changement de conformation qui rapproche les domaines intracellulaires des deux monomères^{465,469}. Ce processus a pour effet d'induire la phosphorylation des résidus tyrosine de JAK2 ainsi que son autophosphorylation croisée^{467,468,470}. JAK2 ainsi activé phosphoryle ensuite des résidus tyrosine situés sur le domaine cytoplasmique de l'EPOR qui agissent comme des sites de recrutement et d'ancrage pour les protéines contenant des domaines SH2 (*Src homology region 2*)⁴⁷¹. Après leur fixation, ces protéines contenant des domaines SH2 sont phosphorylées au niveau de résidus tyrosine spécifiques. C'est par ce mécanisme que sont activés les facteurs STAT, la voie de transduction dépendante de la PI3K/AKT, et celle des MAPK^{463,472-477} (Figure 25).

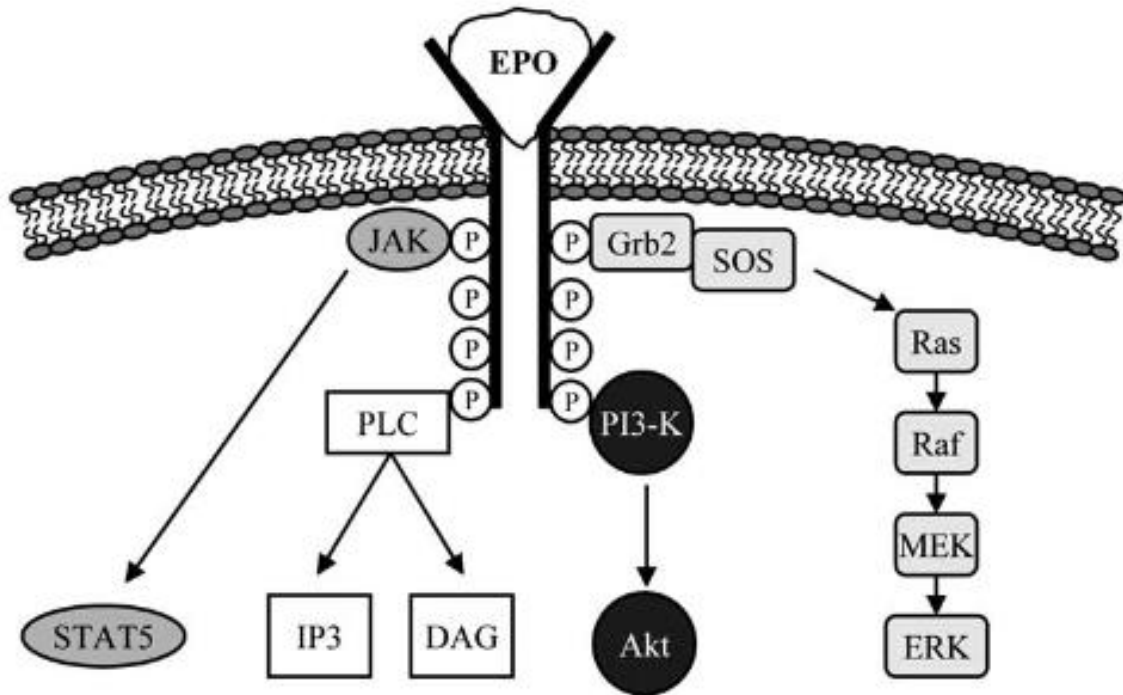


Figure 25. Activation des voies de signalisation intracellulaires par l'érythropoïétine (EPO).

Lorsque l'EPO se lie à son récepteur dimérique EPOR situé sur les progéniteurs érythroïdes, les deux monomères du récepteur se rapprochent. Ce processus déclenche la transphosphorylation de JAK2 ainsi que son activation. JAK2, à son tour, phosphoryle des résidus de tyrosine situés sur l'EPOR ainsi que sur les facteurs STATs. Après la phosphorylation de l'EPOR, la PI3K, la phospholipase C (PLC) et la protéine 2 liée au récepteur du facteur de croissance (GRB2) se lient au récepteur et sont activées, ce qui entraîne la stimulation de multiples processus de signalisation intracellulaire. La PI3-K active son effecteur en aval, AKT. La PLC catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol bisphosphate (PIP₂) en deux seconds messagers : l'inositol trisphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG). Enfin, GRB2 se lie au facteur d'échange Ras-guanine son of sevenless (SOS) qui, à son tour, active Ras, lequel active la voie classique de la MAPK impliquant Raf, MAPK/ERK kinase, et ERK. Enfin, l'EPO entraîne des modifications de la transcription des gènes en réponse à l'activation de ces voies de signalisation intracellulaires (D'après Burger et al., 2009⁴⁷⁸).

III.5.1.2. Voie de signalisation des STAT induite par EPO/EPOR

Les protéines STAT sont caractérisées par leur double capacité à fonctionner comme des médiateurs de signalisation cytoplasmique ou des facteurs de transcription, d'où leur nom : *signal transducers and activators of transcription*⁴⁷⁷.

À ce jour, sept protéines STAT ont été identifiées : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5 (STAT5A et STAT5B) et STAT6⁴⁷⁹. Les sept protéines STAT partagent un motif structurel commun composé d'un domaine N-terminal suivi d'un domaine *coiled-coil*, d'un domaine de liaison à l'ADN, d'un domaine SH2 et d'un domaine de transactivation C-terminal (Figure 26). Les domaines N-terminal et SH2 médient la formation d'homo- ou d'hétérodimères, tandis que le domaine *coiled-coil* fonctionne partiellement comme un signal de localisation nucléaire

(NLS). L'activité transcriptionnelle et l'association à l'ADN sont déterminées par les domaines de transactivation et de liaison à l'ADN, respectivement⁴⁷⁷.

Après sa fixation à l'EPOR par l'intermédiaire de leur domaine SH2, le facteur STAT devient lui-même un substrat de JAK. La phosphorylation d'un résidu tyrosine conservé situé entre le domaine SH2 et le domaine de transactivation C-terminal entraîne la dimérisation de STAT sous forme d'homo- ou d'hétérodimères. La dimérisation est suivie de la translocation vers le noyau, où les dimères STAT se lient à des séquences palindromiques spécifiques situées dans les régions promotrices des gènes cibles, ce qui initie alors une réponse transcriptionnelle adaptée^{477,480,481}.



Figure 26. Organisation des domaines STAT.

Schéma montrant l'organisation des domaines de la protéine STAT. NT : région N-terminale, DBD : domaine de liaison à l'ADN, TAD : domaine d'activation transcriptionnelle (Figure adaptée à partir de Kiu et Nicholson⁴⁷⁷).

La voie JAK2/STAT5 dépendante de l'EPO est essentielle à l'activation de gènes fondamentaux qui favorisent la survie des progéniteurs, la prolifération et la différenciation érythroïde.

Au sein des progéniteurs érythroïdes, elle induit notamment l'expression de BCL-xL, une molécule anti-apoptotique⁴⁸².

STAT5 contrôle une étape déterminante pour la survie des érythroblastes précoces au cours de l'érythropoïèse normale. En effet, un déficit en BCL-xL induit *in vivo* par l'abolition de STAT5 dans des érythroblastes de souris entraîne l'incapacité des érythroblastes précoces à progresser dans la différenciation. Plus précisément, l'altération de la signalisation anti-apoptotique EPOR chez les nouveau-nés $STAT5a^{-/-}5b^{-/-}$ dans des conditions de croissance rapide entraîne l'apoptose des progéniteurs les plus sensibles et provoque une anémie. Chez les adultes $STAT5a^{-/-}5b^{-/-}$, le déficit de la signalisation anti-apoptotique EPOR peut en partie être compensée par une augmentation de la taille de la population érythroblastique précoce. Il peut en résulter une augmentation de l'apoptose accompagnée d'une amélioration des taux de production des GR au détriment d'une expansion du tissu érythropoïétique⁴⁸³.

Par ailleurs, STAT5 a été identifié comme un facteur clé de la régulation du métabolisme

ferrique érythroïde *in vivo*. Le TFR1 et la protéine régulatrice du fer 2 (IRP2 ou *Iron regulatory protein 2*), principal régulateur traductionnel de la stabilité de l'ARNm TFR1, sont des cibles transcriptionnelles directes de STAT5. Dans des cellules érythroïdes d'embryons de souris déficitaires en STAT5, les niveaux d'expression de ces deux gènes ont été fortement diminués, ce qui a provoqué une chute de l'absorption du fer. Cette carence en fer induite par le déficit en STAT5 a entraîné une anémie microcytaire sévère⁴⁸⁴.

Récemment, des techniques complémentaires par RNA-seq et ChIP-seq ont été réalisées dans des cellules érythroïdes murines afin d'identifier les gènes cibles de pSTAT5 dépendants de l'EPO. Parmi les gènes de la voie EPOR-JAK2-pSTAT5 retrouvés, figurent des cibles directes connues de pSTAT5 tels que *Bcl2l1*, *Pim1* et *Cish*, ainsi que de nombreuses nouvelles cibles susceptibles d'être impliquées dans le déroulement de la différenciation des cellules érythroïdes, notamment celles impliquées dans l'épissage de l'ARNm (*Rbm25*), la régulation épigénétique (*Suv420h2*) et le renouvellement de l'EPOR (*Clint1/EpsinR*)⁴⁸⁵.

III.5.1.3. Voie de signalisation des MAP kinases induite par EPO/EPOR

L'interaction EPO/EPOR joue un rôle crucial dans l'activation de la voie de signalisation des MAPK kinases (MAPK ou *Mitogen-activated protein kinases*)⁴⁷⁵.

Cette voie implique la phosphorylation d'un résidu tyrosine de SHIP1 (*SH2 domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase 1*), une phosphatase capable de se lier à l'EPOR dans sa partie intracellulaire. L'activation de SHIP1 entraîne le recrutement de protéines adaptatrices comme SHC (*SRC homology and Collagen*) et GRB2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*)⁴⁸⁶. GRB2 se lie ensuite à la protéine SOS (*son of sevenless*), le facteur d'échange de nucléotide guanine sur RAS, ce qui va permettre d'activer la protéine Ras, qui à son tour, déclenche une cascade de phosphorylation, en activant la voie classique des MAPK qui inclue la protéine RAF, les MAP kinase kinases MEK1/2, et les kinases ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase 1/2*)^{478,487}.

La voie des MAPK, nécessaire à l'expansion des progéniteurs érythroïdes humains, est à la fois médiée par les signaux EPOR et c-KIT, les récepteurs EPOR et c-KIT étant stimulés par les ligands EPO et SCF (*Stem Cell Factor*) respectivement^{478,488}. Toutefois, seule la signalisation EPOR semble être capable de diriger la maturation érythroïde terminale⁴⁶². Des effets additifs entre le SCF et l'EPO sur l'activation ont en outre été observés dans les lignées FDCER, mais l'activation d'ERK via c-KIT a montré un effet plus puissant⁴⁵⁹.

III.5.1.4. Voie de signalisation PI3K induite par EPO/EPOR

L'interaction EPO/EPOR conduit à l'activation de la voie PI3K qui active notamment son effecteur en aval, la protéine kinase B (AKT)⁴⁷⁸.

Après la phosphorylation d'EPOR, la PI3K se lie au récepteur et s'active. PI3K activé convertit alors le lipide membranaire phosphatidylinositol-4,5 bisphosphonate PI(4,5)P2 en PI(3,4,5)P3. PI(3, 4, 5)P3 est un second messager essentiel à la translocation d'AKT vers la membrane plasmique où il est phosphorylé et activé par les kinases phosphoinositide-dépendants (PDK) 1 et PDK2⁴⁸⁹⁻⁴⁹¹.

AKT est une sérine/thréonine kinase. L'activation d'AKT joue un rôle central dans les fonctions cellulaires fondamentales telles que la prolifération, la survie ou encore la différenciation cellulaire en phosphorylant une multitude de substrats situés en aval. À ce jour, plus de 150 protéines ont été identifiées comme des médiateurs impliqués dans la voie PI3K/AKT. Parmi ces protéines cibles, figurent notamment les molécules pro-apoptotiques BAD et BAX, la molécule anti-apoptotique BCL-xL, la kinase IKK, la caspase 9, les facteurs de transcription GATA1, GATA2, FOXO3A et CREB et le coactivateur transcriptionnel P300 (Tableau III)⁴⁹².

Au cours de la maturation des progéniteurs érythroïdes, AKT exerce ses effets anti-apoptotiques et pro-survie par le biais de deux fonctions. La première fonction consiste à phosphoryler certaines protéines pro-apoptotiques, ce qui a pour effet de les bloquer. Il s'agit par exemple des protéines de la famille BCL2 (*B-cell lymphoma 2*) telles que BAX (*BCL2-associated X*) ou BAD (*BCL2 Associated Agonist Of Cell Death*) ou encore la caspase 9⁴⁹³⁻⁴⁹⁵. La deuxième fonction se rapporte à la régulation de certains facteurs de transcription qui peuvent induire l'expression de gènes anti-apoptotiques comme CREB (*C-AMP Response Element-binding protein*)⁴⁹⁶, la kinase IKB (inhibiteur de kappa B)⁴⁹⁷, ou encore la protéine MDM2⁴⁹⁸.

Cependant, la maturation érythroïde des cellules transduites par AKT ne dépend pas uniquement des signaux de survie ou de prolifération cellulaire induits par AKT. En effet, dans un modèle de maturation érythroïde induite *in vitro* par l'EPO à partir de progéniteurs érythroïdes de foie foetal, la régulation négative de l'expression de la kinase AKT par ARN interférent, ou bien de son activité par l'hyperexpression d'une forme négative dominante d'AKT, inhibe de manière significative la formation de CFU-E ainsi que l'expression des gènes érythroïdes. Cela démontre qu'AKT soutient également la différenciation des cellules érythroïdes induite par l'EPO⁴⁹⁹.

Aussi, après son activation, AKT peut transloquer vers le noyau où elle peut activer plusieurs substrats, tels que des facteurs de transcription responsables de la maturation cellulaire et de la

progression de la différenciation érythroïde⁵⁰⁰.

AKT est capable d'activer certains facteurs de transcription nécessaires à la différenciation des cellules érythroïdes. Par exemple, GATA1, qui représente un des facteurs de transcription les plus importants dans la différenciation érythroïde, est une cible phosphorylable par la voie PI3K/AKT⁴⁷⁴.

Dans les cellules érythroïdes, l'expression de l'inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase matricielle (TIMP-1) est strictement dépendante de l'EPO et de GATA1. La voie PI3K/AKT qui agit en aval de l'EPOR, phosphoryle directement le facteur de transcription GATA1 au niveau de la sérine 310 et ce dernier processus est nécessaire à l'activation transcriptionnelle du promoteur de TIMP-1. L'expression par rétrovirus d'une forme mutée de GATA1 qui ne peut pas être phosphorylée au niveau de la sérine S310 retarde la cinétique de la différenciation érythroïde des cellules souches embryonnaires de souris *GATA1^{null}*⁵⁰¹.

Par ailleurs, la voie PI3K/AKT joue un rôle dans l'autophagie, processus indispensable à l'élimination des organites tels que les ribosomes et les mitochondries (mitophagie) au cours de l'érythropoïèse. Le dysfonctionnement des protéines impliquées dans l'autophagie entraîne une perturbation de la maturation érythroïde, qui peut se traduire par une anémie, la libération de cellules immatures par la moelle osseuse ou par d'autres anomalies hématologiques^{502,503}. Les travaux de Zhou *et al.* indiquent que le facteur de transcription FOXO3 (*Forkhead box O3*) régule positivement l'activité de la voie PI3K/AKT en transactivant la sous-unité catalytique PIK3CA, qui induit à son tour une phosphorylation et une régulation positive de l'activité d'AKT1. AKT1 activée catalyse ensuite la phosphorylation du facteur de transcription FOXO1 (*Forkhead box O1*), ce qui entraîne la translocation de ce dernier vers le cytoplasme⁵⁰⁴. Dans le cytoplasme, FoxO1 induit finalement l'autophagie en se liant à ATG7, un régulateur clé de la formation des autophagosomes⁵⁰⁵. Il est à noter qu'AKT peut phosphoryler FOXO3 sur le résidu S253 et provoquer subséquemment la translocation de FOXO3 vers le cytoplasme. FoxO3a se lie ensuite à 14-3-3 et cette interaction favorise sa dégradation par le protéasome⁵⁰⁶.

Substrats d'AKT	Sites de phosphorylation	Fonctions associées
BAD	S136	Molécule proapoptotique ; sa phosphorylation inhibe l'apoptose
BAX	S184	Molécule proapoptotique ; sa phosphorylation inhibe l'apoptose
BCL-XS	S106	Molécule anti-apoptotique ; essentiel à la différenciation érythroïde
IKK	S23	Kinase ; sa phosphorylation active NF- KB
GATA1	S310	Facteur de transcription ; sa phosphorylation favorise la différenciation érythroïde
GATA2	S401	Facteur de transcription ; régulation de la prolifération et de la maintenance des progéniteurs érythroïdes ; sa phosphorylation inhibe son activité
Caspase 9	S183, S196	Protéase impliquée dans l'apoptose ; sa phosphorylation inhibe son activité
FOXO3A	T32, S253, S315	Facteur de transcription indispensable à la maintenance de long terme des CSH ; sa phosphorylation inhibe son activité
CREB	S133	Facteur de transcription ; sa phosphorylation augmente la transcription des gènes de survie
P300	S1834	Co-activateur transcriptionnel ; sa phosphorylation augmente l'activité HAT de P300

Tableau III. Substrats de la voie PI3K/AKT, sites de phosphorylations et fonctions associées.

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique ; HAT : Histone Acétyl Transférase (Tableau adapté à partir de Jafari et al., 2018⁴⁹²).

La PI3K peut être activée par l'EPO par deux autres mécanismes qui diffèrent de l'association directe de la PI3K avec l'EPOR. Ce sont la phosphorylation de GAB (*growth factor-bound protein (Grb)-associated binder*) et la phosphorylation des protéines adaptatrices de la protéine IRS2 (*Insulin receptor substrate 2*). Chacun de ces mécanismes conduit à la phosphorylation des effecteurs en aval de la PI 3-kinase : AKT, FKHRL1 et P70S6-kinase. De plus, l'activation de PI 3-kinase médie la prolifération induite par l'EPO par la régulation négative de l'expression de p27Kip1⁴⁹¹.

III.5.1.5. Voie de signalisation de la phospholipase C induite par EPO/EPOR

La voie de signalisation impliquant la phospholipase C (PLC) et son substrat le phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate (PIP2) qui génère les messagers secondaires IP3 et DAG pourrait être impliquée dans l'érythropoïèse. En effet, dans les cellules érythroleucémiques UT7/EPO, l'EPO induit la phosphorylation d'un résidu tyrosine de la phospholipase C-gamma 1 (PLC-gamma 1). L'activation de la PLC-gamma 1 qui en résulte entraîne la production d'inositol 1,4,5-trisphosphate (Ins-P3) puis la mobilisation du calcium des réserves intracellulaires⁵⁰⁷.

La protéine kinase C (PKC), effecteur qui agit en aval de la voie du PLC au niveau de la membrane s'active en réponse aux seconds messagers que sont le calcium (Ca²⁺) et le diacylglycérol (DAG)⁵⁰⁸. PKC est impliquée dans l'activation de multiples cibles de la signalisation de l'EPO, mais son rôle exact dans la transduction du signal d'EPOR et dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des érythroïdes reste mal connu⁵⁰⁹. Il a été démontré que la stimulation par l'EPO induit une différenciation érythroïde des cellules CD34+ qui s'accompagne d'une régulation positive des niveaux d'expression des isoformes de PKC, ainsi que leur translocation nucléaire. Inversement, la régulation négative de l'expression des isoformes de PKC inhibe la différenciation érythroïde des cellules CD34+ induite par l'EPO⁵¹⁰.

III.5.2. Transduction du signal du SCF et coopération entre EPO/EPOR et SCF/c-KIT dans l'érythropoïèse

III.5.2.1. Voie de signalisation de STAT5 induite par SCF/c-KIT

Dans les proérythroblastes, la phosphorylation de la tyrosine de STAT5, cible située en aval de la protéine non-récepteur à tyrosine kinase JAK2, est médiée par l'EPO mais pas par le SCF⁴⁸⁸. Cependant, la stimulation de c-KIT par son ligand SCF intervient dans la régulation de la voie EPOR-STAT5-Bcl-x(L) de manière à favoriser la survie, la prolifération et la différenciation

des progéniteurs érythroïdes. En effet, en l'absence de GATA1, c-KIT induit l'expression de la molécule anti-apoptotique BCL2, ainsi que celles de l'EPOR, de STAT5 et de BCL-xL, ce qui lui permet d'agir en synergie avec EPOR dans la prolifération et la survie des progéniteurs érythroïdes. Par la suite, l'expression de GATA1 entraîne la différenciation érythroïde terminale, une régulation négative de c-KIT et de BCL2, et une régulation positive d'EPOR et de BCL-xL, conduisant à une augmentation significative de la survie des progéniteurs érythroïdes en cours de différenciation⁵¹¹.

D'autres données montrent qu'une activation de STAT5 dépendante de c-KIT via JAK2 pouvait se produire dans les cellules hématopoïétiques primaires immatures de souris. En effet, dans des cellules WT cS5 (*constitutively activated Stat5a mutant*), le SCF seul a induit une phosphorylation robuste de STAT5, qui a été renforcée par la combinaison de l'EPO et du SCF. Dans les cellules EPOR^{-/-}-cS5 et JAK2^{-/-}-cS5, l'activation de STAT5 a également été induite par le SCF. Par ailleurs, l'activation de cS5 dépendante du SCF est complètement dépendante de l'activité kinase de c-KIT, étant donné qu'elle est bloquée par l'imatinib, un inhibiteur de c-KIT. A partir de ces données, Grebien et al. propose un modèle dans lequel EPOR et c-KIT coopèrent de manière à activer la voie JAK-STAT5 au sein des cellules hématopoïétiques immatures, co-exprimant des récepteurs de cytokine et des récepteurs à tyrosine kinase de facteurs de croissance⁴⁶³.

III.5.2.2. Voie de signalisation des MAP kinases induite par SCF/c-KIT

Les MAP kinases p44/42 ERK1 et 2 sont phosphorylées par EPO ou SCF, SCF entraînant une phosphorylation prolongée et plus importante d'ERK1 et 2 par rapport à EPO⁴⁸⁸.

De nombreuses études montrent que la régulation négative de la signalisation c-KIT est une condition préalable à la différenciation terminale dirigée par EPOR/STAT5. Par exemple, Haas et al montre qu'une mutation activatrice de c-KIT bloque la différenciation érythroïde, via la signalisation médiée par les MAPK et que ce phénotype est partiellement corrigé par l'inhibition des MAPK⁵¹². Plus précisément, la signalisation MAPK induite par KIT rend les cellules résistantes aux signaux de différenciation déclenchés par EPOR, ce qui favorise l'état indifférencié des cellules érythroblastes. En effet, dans un modèle de souris qui exprime de façon inductible un récepteur KIT portant une mutation activatrice (KIT^{D816V}), la signalisation prolongée de KIT entraîne une expansion des précurseurs érythroïdes et interfère avec la maturation terminale au-delà du stade d'érythroblaste. Les érythroblastes primaires KIT^{D816V} conservent en outre l'expression des facteurs c-MYC, c-MYB et GATA2 associés aux cellules progénitrices et produisent une régulation positive insuffisante sur l'expression des facteurs de

transcription érythroïdes GATA1, KLF1 et TAL1. De plus, ces cellules sont caractérisées par une activation constitutive de la voie de la protéine kinase activée par des agents mitogènes (MAPK), une expression élevée de LYN, membre de la famille SRC kinase, et une altération de l'activation d'AKT en réponse à l'EPO. Ce blocage de la différenciation est partiellement corrigé par l'inhibition de la MAPK, et complètement corrigé par l'inhibiteur multikinase Dasatinib⁵¹².

Il a été en outre démontré que l'expression de K-ras entraîne un blocage partiel de la différenciation érythroïde et une hyperactivation de la signalisation des MAPK⁵¹³. Inversement, l'inactivation de la protéine ERK accélère la différenciation érythroïde des cellules tandis que l'activation de MEK1 y fait obstacle⁵¹⁴.

En faveur de ces études, une analyse récente par spectrométrie de masse de la dynamique des phosphoprotéomes combinée à un criblage CRISPR/Cas9 ciblé sur les kinomes a démontré que la régulation négative de l'axe de signalisation c-KIT/MAPK est un facteur clé de la maturation. L'activité de c-KIT et la phosphorylation de ERK2 sont en effet régulées négativement avant la perte d'activité d'EPOR/JAK2 et la maturation érythroïde est accélérée par l'inhibition des composants de signalisation MAPK/ERK. Ces études suggèrent qu'il se produit une transition de l'activité Ras/MAPK/ERK dominante de c-KIT vers l'activité EPOR/STAT5 au cours de l'érythropoïèse⁴⁵².

III.5.2.3. Voie de signalisation PI3K/AKT induite par SCF/c-KIT

Dans les CSH, la signalisation PI-3 kinase/PKB induite par la stimulation du récepteur c-KIT par son ligand SCF est essentielle à l'activation de ERK. En effet, en l'absence de l'activité PI-3 kinase, l'activation de RAS est insuffisante pour l'activation de ERK induite par SCF. De plus, la différenciation des CSH entraîne un passage d'une activation de ERK dépendante de la PI-3 kinase à une activation indépendante de la PI-3 kinase. Aussi, la signalisation PI-3 kinase/PKB intervient dans le maintien des cellules progénitrices hématopoïétiques à l'état multipotent et un changement de signalisation moléculaire dans la voie c-KIT se produit lors de la différenciation des cellules progénitrices/souches hématopoïétiques immatures en types de cellules plus engagées⁵¹⁵. D'après Arcasoy et al., la phosphorylation d'AKT, molécule de signalisation en aval de la PI3K est médiée principalement par SCF⁴⁸⁸.

III.5.2.4. Voie des kinases de la famille SRC induite par SCF/c-KIT

La stimulation de c-KIT par SCF active plusieurs voies de signalisation précoces distinctes, notamment la phospholipase C gamma, la phosphatidylinositol 3-kinase, GRB2 et GRB7, ainsi que les kinases de la famille SRC (SFK). SRC médie la signalisation Ras/MAPK. SRC joue un rôle essentiel dans la régulation de la croissance, de la prolifération et de la coopération avec EPOR en aval de KIT^{460,516}. En effet, au sein des cellules progénitrices érythroïdes G1E-ER2SRC mutantes KIT déficientes en SRC, il a été constaté que l'altération de la coopération entre le mutant KIT et EPOR était associée à une réduction de la transphosphorylation d'EPOR et de l'expression de c-MYC. De façon remarquable, la restauration de la seule voie SRC dans les cellules mutées KIT déficientes dans l'activation de toutes les voies de signalisation précoce permet de restaurer 50% de la prolifération en réponse à la stimulation KIT et de restaurer complètement la coopération avec EPOR⁴⁶⁰.

Parmi les kinases de la famille SRC, LYN (*Lck/Yes novel tyrosine kinase*) est connue pour jouer un rôle subsidiaire important dans la régulation du compartiment érythroïde. D'après Slavova-Azmanova et al., LYN facilite la production normale d'érythrocytes en influençant les différentes étapes de l'expansion et de la maturation des progéniteurs érythroïdes ainsi que leur survie. Cette protéine tyrosine kinase favorise les signaux pro-survie GAB2/AKT/FoxO3 (*forkhead box O3*), la rétroaction négative des signaux JAK2/STAT5 et ERK1/2 via la phosphotyrosine phosphatase SHP1 (*Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1*)⁵¹⁷.

De plus, il a été démontré que LYN, via des mécanismes intrinsèques aux cellules érythroïdes, favorise l'expansion des cellules progénitrices au-delà du stade KIT⁺/CD71^{high} ainsi que le développement ultérieur à un stade avancé⁵¹⁸. Dans des érythroblastes murins déficients en LYN, l'altération de la signalisation intracellulaire, à la fois dépendante et indépendante de l'EPO, perturbe de manière significative la viabilité des cellules érythroïdes, en particulier au cours des derniers stades de leur développement⁵¹⁷. Une conséquence potentielle est que les niveaux de progéniteurs et de précurseurs érythroïdes s'élèvent en réponse au défaut de leur maturation/viabilité à un stade avancé. Cependant, l'expansion érythroïde restant insuffisante, une anémie liée à l'âge se développe^{519,520}. En effet, des souris déficientes en LYN ont présenté des précurseurs érythroïdes avec des niveaux de STAT5, EKLF et GATA1 réduits de manière significative ainsi qu'une production extramédullaire de GR, caractéristique d'un érythropoïèse de stress qui compense les défauts érythroïdes intrinsèques et extrinsèques⁵¹⁹. L'équipe de Karur et al. décrit dans un modèle murin LYN^{-/-} un mécanisme compensateur, par lequel des

érythroblastes dérivés de moelle osseuse, expriment des niveaux accrus d'AKT et de p60-Src activés ainsi que des niveaux réduits de protéine kinase-2 associée à la mort⁵¹⁸.

III.5.3. Régulation négative de la voie JAK2/STAT5 dans l'érythropoïèse

III.5.3.1. Rôle des protéines à domaine SH2 : SHP1 et SH2B3

L'activité de STAT5 est régulée par les mécanismes d'inhibition de la protéine-tyrosine phosphatase SHP1 et de la protéine adaptatrice SH2B3 (*Src homology 2 B adaptor protein 3*) également appelée LNK (*Lymphocyte specific adapter protein*)⁵²¹.

La tyrosine phosphatase SHP1 contenant le domaine SH2 régule négativement la différenciation érythroïde et la suppression de l'apoptose. En effet, son recrutement au niveau d'un segment de l'EPOR entraîne la déphosphorylation de JAK2 et la régulation négative des signaux de l'EPOR⁵²². Dans les cellules érythroleucémiques J2E, elle intervient notamment dans l'inactivation des cibles qui sont cruciales à l'induction de la voie JAK/STAT ainsi que de la voie Ras/Raf/MAP kinase médiées par l'EPO⁵²³.

Appartenant à la famille des protéines adaptatrices LNK/SH2B, LNK contient trois domaines fonctionnels : un domaine de dimérisation (DD) et des motifs riches en proline à l'extrémité amino-terminale (NT), suivis d'un domaine central d'homologie de Pleckstrin (PH) et d'un domaine d'homologie 2 de Src (SH2)⁵²⁴. Bien que l'expression neuronale et endothéliale ait été démontrée⁵²⁵⁻⁵²⁷, LNK est principalement exprimée dans les cellules et tissus hématopoïétiques, en particulier dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH) et les progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes⁵²⁸. Des techniques d'imagerie ont montré que LNK se localisait principalement au niveau de la membrane plasmique dans les lignées 293T et BaF/3, tandis que la protéine était retrouvée en grande majorité dans la région périnucléaire dans les cellules COS-7 avec une localisation membranaire mineure^{529,530}.

Le domaine SH2 de LNK (ou SH2B3) assure la médiation de la plupart des effets biologiques par le biais d'interactions avec ses partenaires de signalisation phosphorylés, notamment les récepteurs de cytokines et de tyrosine kinase (EPOR, c-KIT) ou les kinases (JAK2)⁵³¹⁻⁵³⁴. Dans des modèles murins LNK^{-/-}, il a été démontré que LNK possède un effet inhibiteur global sur la prolifération des CSH, des progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes, ainsi que des cellules matures, principalement des lignées érythroïdes et mégacaryocytaires^{524,528,535,536}. Plus spécifiquement, LNK inhibe l'érythropoïèse en modulant la signalisation médiée par des cytokines spécifiques de la lignée érythroïde, notamment l'EPO. En effet, les souris déficientes

en LNK présentent un nombre accru de progéniteurs érythroïdes et les UFC-érythroïdes (UFC-E) de la rate sont hypersensibles à l'EPO. Inversement, la surexpression de LNK dans les progéniteurs érythroïdes inhibe la différenciation érythroïde dépendante de l'EPO et induit l'apoptose. Sur le plan fonctionnel, c'est par l'intermédiaire de son domaine SH2, LNK (ou SH2B3) atténue directement la phosphorylation d'EPOR et donc l'activation de JAK2, ce qui lui permet d'inhiber les principales voies de signalisation induites par EPO/EPOR et notamment les voies STAT5 et MAPK dans les érythroblastes primaires^{524,531}.

III.5.3.2. Rôle des protéines de la famille CISH/SOCS

Au sein de la famille CISH/SOCS (*cytokine inducible SH2-containing protein/suppressor of cytokine signalling*) des protéines inductibles par les cytokines, CISH ainsi que les suppresseurs de la signalisation des cytokines SOCS1 et 3, se sont avérés être les inhibiteurs les plus puissants de la signalisation de l'EPO^{537,538}. En effet, dans des lignées de cellules hématopoïétiques sensibles à l'EPO, la surexpression de CISH, de SOCS1 ou de SOCS3 régule négativement la prolifération cellulaire médiée par l'EPO, ainsi que la phosphorylation de STAT5. En revanche, SOCS2 s'est montré moins efficace, et SOCS4 inefficace dans la neutralisation de ces processus médiés par l'EPO⁵³⁸.

Une caractéristique clé de la famille CISH/SOCS est la présence d'un domaine SH2 et d'une boîte SOCS. De manière générale, il a été suggéré que le domaine SH2 fonctionne comme un domaine de liaison à la phosphotyrosine, tandis que la boîte SOCS favorise l'interaction avec la culline 5/2 qui intervient dans la formation d'un complexe ubiquitine ligase E3⁵³⁹⁻⁵⁴¹. La protéine SOCS1 favorise l'ubiquitinylation et la dégradation médiée par l'UPS de la protéine JAK2 activée, par l'intermédiaire de son activité ubiquitine ligase E3. Ce processus fait intervenir la boîte SOCS C-terminale de SOCS1 ainsi que la phosphorylation de JAK2⁵⁴². De plus, SOCS1 a la capacité d'inhiber directement l'activité catalytique de trois membres de la famille JAK : JAK1, JAK2 et TYK2. Cette activité repose sur un court motif, situé immédiatement en amont du domaine SH2, connu sous le nom de KIR (*kinase inhibitory region*), qui bloque le sillon de liaison au substrat de la kinase⁵⁴³.

SOCS3 (*Suppressor of cytokine signaling 3*), encore appelé CIS3 (*cytokine-inducible SH2 protein-3*) ou SSI3 (*STAT-induced STAT inhibitor 3*), est également capable d'inhiber la prolifération médiée par l'EPO et l'activation de STAT5. Plus précisément, SOCS3 se lie à l'EPOR ainsi qu'à JAK2 dans les progéniteurs érythroïdes et les cellules Ba/F3 exprimant l'EPOR. L'interaction de SOCS3 avec JAK2 via le domaine SH2 de SOCS3 est une condition

préalable à l'inhibition du signal de l'EPO, tandis que l'interaction avec EPOR augmente l'effet négatif de SOCS3 sur la signalisation de l'EPO, comme la prolifération des cellules Ba/F3 dépendante de l'EPO et l'activation de JAK2-STAT5⁵⁴⁴. Cependant, bien que SOCS3 soit un inhibiteur bien connu de JAK2 de type sauvage, cette protéine potentialise l'activité de JAK2^{V617F}. En effet, au lieu d'agir comme un suppresseur, SOCS3 augmente la prolifération des cellules exprimant à la fois JAK2^{V617F} et EPOR. De plus, le renouvellement de SOCS3 est inhibé par l'activité kinase mutante de JAK2, ce qui est corrélé à une phosphorylation marquée de la tyrosine de la protéine SOCS3. Ainsi, les cellules mutées JAK2^{V617F}, en hyperphosphorylant SOCS3, pourrait exploiter SOCS3 de manière à surmonter la régulation normale de SOCS3 et potentialiser leur capacité myéloproliférative⁵⁴⁵.

Le gène suppresseur de tumeur *SOCS2* est un antagoniste non seulement de JAK2 de type sauvage (*JAK2^{wt}*), mais aussi de JAK2^{V617F}. *SOCS2* se lie vraisemblablement aux récepteurs des cytokines⁵⁴⁶. Il a été démontré, dans des lignées cellulaires dérivées de leucémie myéloïde aiguë mutante JAK2^{V617F} (*JAK2^{mut}*), que le knockdown de *SOCS2* induit une augmentation de la phosphorylation constitutive de STAT5, tandis que la surexpression de *SOCS2* inhibe sa phosphorylation, ce qui confirme que *SOCS2* agit comme un antagoniste de JAK2^{V617F}. Selon Hookham et al., la régulation négative de l'expression du gène *SOCS2* dans les syndromes myéloprolifératifs, pourrait constituer une deuxième étape importante dans la croissance cellulaire indépendante des cytokines, faisant suite à l'activation de l'oncogène JAK2^{V617F}⁵⁴⁷.

III.5.3.3. Autres molécules intervenant dans la régulation négative de STAT5

PIM1 est un proto-oncogène qui code la sérine/thréonine kinase du même nom. *PIM1* est capable d'interagir avec *SOCS1* et *SOCS3* de manière à potentialiser leurs effets inhibiteurs sur *STAT5*, très probablement via la stabilisation des protéines *SOCS* par phosphorylation, ce qui a pour effet d'inhiber la transcription dépendante de *STAT5* dans plusieurs lignées cellulaires sensibles aux cytokines⁵⁴⁸.

CLINT1 (*clathrin interactor 1*) est impliqué dans l'endocytose médiée par la clathrine, qui est le mécanisme par lequel les progéniteurs érythroïdes acquièrent du fer via la liaison transferrine-fer au *TFR1* ; il a été également signalé qu'il est impliqué dans l'internalisation d'*EPOR*^{549,550}.

Les gènes codant *CISH*, *SOCS3*, *PIM1* et *CLINT1* ont été identifiés comme des gènes cibles de *STAT5*. Aussi, ces protéines pourraient être des composants d'un mécanisme de rétroaction négative qui permet à *STAT5* d'atténuer sa propre activité^{485,548}. Récemment, des techniques

complémentaires par RNA-seq et ChIP-seq réalisées dans des cellules érythroïdes murines ont permis de retrouver d'autres gènes cibles de pSTAT5 dépendants de l'EPO, tels que *BCL2L1* ou des gènes impliqués dans l'épissage de l'ARNm (*Rbm25*) ou la régulation épigénétique (*Suv420h2*)⁴⁸⁵.

Enfin, il est à noter que la famille des protéines 14-3-3 est capable d'antagoniser l'action inhibitrice de LNK sur la voie JAK2/STAT5. Les protéines 14-3-3 sont des polypeptides acides de 28 à 33 kDa. Hautement conservées, sept membres de la famille sont présents chez les mammifères : β , γ , ϵ , σ , τ (également appelé θ), ζ et η . Les protéines 14-3-3 sont capables d'interagir avec de nombreuses protéines différentes grâce à leur activité spécifique de liaison phospho-sérine/phospho-thréonine. Toutefois, toutes les interactions ne sont pas dépendantes de la phosphorylation⁵⁵¹. Dans les CSH de souris, la liaison de 14-3-3 à LNK permet de séquestrer LNK dans le cytoplasme en le tenant à l'écart de JAK2, qui est associée à la membrane plasmique, ce qui limite l'interaction LNK/JAK2 et explique ainsi les effets positifs de 14-3-3 sur la prolifération cellulaire⁵⁵².

III.5.4. Un exemple de pathologie impliquant une hyperactivation de la voie JAK2/STAT5 : la polyglobulie de Vaquez

La polyglobulie vera ou polyglobulie primitive de Vaquez (PV) est une maladie myéloproliférative acquise à caractère clonal, caractérisée par la présence d'une polyglobulie diversement associée à une thrombocytose, une leucocytose et une splénomégalie. Cette maladie apparaît dans une cellule progénitrice hématopoïétique multipotente qui entraîne principalement la production accrue et incontrôlée de GR, et le plus souvent, celle des leucocytes, des plaquettes et de leurs progéniteurs morphologiquement normaux, en l'absence d'un stimulus identifiable et à l'exclusion de l'hématopoïèse non clonale⁵⁵³.

Dans la PV, Les progéniteurs sont hypersensibles à l'EPO et à d'autres cytokines⁵⁵⁴.

Le gène *JAK2* impliqué dans la signalisation intracellulaire est muté chez plus de 90 % des patients atteints de PV. Cette mutation activatrice appelée *JAK2*^{V617F} est également observée dans 50 à 60 % des cas de myélofibrose primaire et 50 % des cas de thrombocytémie essentielle⁵⁵⁵⁻⁵⁵⁷.

Les études cytogénétiques montrent la présence d'un caryotype anormal dans les cellules progénitrices hématopoïétiques chez environ 34 % des patients atteints de PV. Au moment du diagnostic, 20 % des patients présentent des anomalies cytogénétiques, ce chiffre passant à plus de 80 % chez ceux qui bénéficient d'un suivi de plus de 10 ans. La moelle osseuse des patients

atteints de PV contient des cellules souches clonales anormales qui suppriment la croissance et la maturation des cellules souches normales. La cause de la panmyélose est une prolifération néoplasique dysrégulée⁵⁵⁵.

III.5.4.1. Mutation activatrice JAK2^{V617F}

A l'état physiologique, lorsque l'EPO interagit avec son récepteur EPOR à la surface de la membrane de l'érythroblaste, les monomères intracellulaires du récepteur se rapprochent, ce qui transactive la protéine JAK2 par phosphorylation. JAK2 phosphorylée entraîne ensuite l'activation en aval de voies de signalisation et en particulier l'activation et la dimérisation de STAT5, facteur de transcription qui peut alors se transloquer vers le noyau et induire l'expression de gènes érythroïdes.

Chez la plupart des patients atteints de PV (> 90 %), James et al. ont identifié une mutation clonale unique dans le domaine pseudo-kinase JH2 du gène *JAK2*. Cette mutation, une substitution valine-phénylalanine en position d'acide aminé 617 (*JAK2^{V617F}*) provoque l'activation spontanée de JAK2, qui induit constitutivement l'activité transcriptionnelle de STAT5 en l'absence d'EPO et favorise l'hypersensibilité aux cytokines ainsi que l'érythrocytose. Par ailleurs, il a été démontré que des souris greffées avec des cellules de moelle osseuse exprimant *JAK2^{V617F}* développent une polyglobulie et une splénomégalie⁵⁵⁴.

III.5.4.2. LNK dans le contexte JAK2^{V617F}

Des études NGS ont révélé que plus de 50 % des patients atteints de PV présentent des variantes/mutations de la séquence d'ADN différentes de celles de *JAK2*, les plus fréquentes étant *TET2* (18 %), *ASXL1* (15 %) et *LNK* (3 %)⁵⁵⁸⁻⁵⁶⁰. Dans le contexte des néoplasies myéloprolifératives (NMP), les premières études analysant le rôle de LNK ont montré que son expression est régulée positivement dans les cellules CD34+ et les plaquettes des patients NMP, notamment dans les cas *JAK2^{V617F+}*^{534,561}.

Des analyses biochimiques ont montré que LNK est non seulement capable de se lier à JAK2 de type sauvage mais aussi à *JAK2^{V617F}* principalement par l'intermédiaire de son domaine SH2^{533,534,561}. Sur le plan fonctionnel, le contexte *JAK2^{V617F}* ne semble pas modifier l'inhibition de la voie de signalisation JAK/STAT par LNK. En effet, LNK diminue la signalisation médiée par *JAK2^{V617F}* dans les cellules hématopoïétiques Ba/F3-EPOR et HEL (érythroleucémie, *JAK2^{V617F+}*)^{534,561}.

Il a été suggéré qu'une double altération des gènes *JAK2* et *LNK* serait synergique et favoriserait

davantage le phénotype transformé des cellules mutantes^{524,562}. En effet, l'expression de JAK2^{V617F} dans des cellules de moelle osseuse murine déficientes en LNK a rendu les cellules significativement plus sensibles à la transformation par l'oncogène JAK2 par rapport aux cellules de type sauvage dans les tests clonogéniques et a accéléré l'apparition de la PV JAK2^{V617F} chez les souris^{561,563}. Autrement dit, LNK entraverait la capacité de transformation oncogénique et pourrait donc être considérée comme un suppresseur de tumeur dans les maladies myéloprolifératives.

IV. Rôle des HDAC dans la régulation de l'hématopoïèse

IV.1. Les HDAC dans le maintien de l'homéostasie des CSH

IV.1.1. Classe I des HDAC dans le maintien de l'homéostasie des CSH

HDAC1 et HDAC2 sont des HDAC de classe I qui jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'homéostasie des CSH. La délétion simultanée de HDAC1 et HDAC2 dans des modèles de souris knock-out conditionnels entraîne la perte de CSH et par conséquent une insuffisance médullaire. De plus, la délétion spécifique à la moelle osseuse de *SIN3A*, co-répresseur majeur de HDAC1/2, entraîne la perte de HDAC1 et HDAC2⁵⁶⁴.

Le niveau d'expression d'HDAC1 joue un rôle direct dans la détermination du destin cellulaire des progéniteurs hématopoïétiques. Une surexpression d'HDAC1 dans des cellules progénitrices hématopoïétiques transplantées dans des souris, favorise la différenciation érythro-mégacaryocytaire au détriment de la différenciation myéloïde. À l'inverse, le knockdown d'HDAC1 médié par un petit ARN interférent (siRNA) dirigé contre l'ARNm d'HDAC1 augmente la différenciation myéloïde et perturbe la différenciation érythroïde des cellules progénitrices. Le profil d'expression d'HDAC1 est soumis à la régulation par les facteurs de transcription hématopoïétiques. Par exemple, la transcription du gène *HDAC1* est réprimée par les C/EBPs (*CCAAT-enhancer-binding proteins*) au cours de la différenciation myéloïde, et activée par GATA1 pendant la différenciation érythro-mégacaryocytaire⁵⁶⁵. HDAC3 est une autre HDAC de classe I qui a été identifiée comme un régulateur négatif de l'expansion des CSH humaines. *In vitro*, le knockdown spécifique du transcrit HDAC3 améliore considérablement l'expansion des cellules CD34+ sans affecter la différenciation cellulaire⁵⁶⁶. Par ailleurs, HDAC3 est essentielle à la production des cellules progénitrices lymphoïdes les plus précoces et à l'auto-renouvellement des CSH. Une délétion conditionnelle d'HDAC3 a été

réalisée chez des souris en utilisant le transgène Vav-Cre. Les souris transgéniques déficitaires en HDAC3 étaient viables, mais présentaient une perte spectaculaire des cellules T et B. De plus, les cellules souches et progénitrices HDAC3^{-/-} ne proliféraient pas et la plupart des cellules restaient indifférenciées⁵⁶⁷.

Chez les embryons de poisson-zèbre, l'émergence des CSH à partir de la paroi ventrale de l'aorte dorsale (c'est-à-dire l'endothélium hématogène) est contrôlée par le corépresseur nucléaire NCOR2 (*nuclear receptor co-repressor 2*)⁵⁶⁸. Au cours de ce processus, NCOR2 coopère avec HDAC3 de façon à réprimer la transcription de *FOS*. Lorsque NCOR2 est désactivé, *FOS* est régulé positivement, ce qui induit l'expression de *VEGFD* puis le renforcement de la signalisation Notch. L'activation de Notch entraîne subséquemment la répression de la spécification endothéliale homogène, qui est une condition préalable à l'émergence des CSH⁵⁶⁹. Par ailleurs, HDAC3 est capable de s'associer avec le facteur de transcription GATA2 dans le noyau, ce qui a pour effet de réprimer l'activité transcriptionnelle de GATA2, et donc d'inhiber ses effets dans la survie et la prolifération des CSH⁵⁷⁰.

Un autre membre des HDAC de classe I, HDAC8 joue un rôle clé dans le maintien de la repopulation hématopoïétique à long terme. HDAC8 interagit avec la protéine p53 et module l'activité de cette dernière par désacétylation. Les cellules souches hématopoïétiques de long terme (CSH-LT) déficientes en HDAC8 présentent une hyperactivation de p53 et une augmentation de l'apoptose en cas de stress génotoxique et hématopoïétique⁵⁷¹.

IV.1.2. Classes II et III des HDAC dans le maintien de l'homéostasie des CSH

Certains membres des HDAC de classe II et de classe III sont également impliqués dans l'homéostasie et le vieillissement des CSH. HDAC5, membre de la famille des HDAC de classe IIa, contrôle le trafic des CSH vers la moelle osseuse (*homing*) en induisant la régulation négative de la transcription du récepteur membranaire CXCR4 via la désacétylation de p65, sous-unité de NF-κB. L'interaction entre le récepteur membranaire CXCR4 (*chemokine C-X-C receptor-4*) et son ligand SDF-1 (*Stromal cell-derived factor-1*) est considérée comme un pivot essentiel du processus de homing⁵⁷².

Lors de l'inhibition d'HDAC5, la protéine acétylée p65 se lie à la région du promoteur de *CXCR4*, ce qui a pour effet d'augmenter la transcription du récepteur membranaire CXCR4 puis d'améliorer le homing médié par SDF-1/CXCR4 ainsi que la prise de greffe des CSPH humaines⁵⁷³.

Plusieurs études montrent que les sirtuines, membres de la classe III des HDAC, pourraient protéger les CSH contre le vieillissement⁵⁷⁴. La sirtuine SIRT1 joue un rôle clé dans le maintien homéostatique du pool de CSH, en favorisant la localisation et l'activation nucléaires de son

substrat FOXO3. Les CSH jeunes dépourvues de SIRT1 présentent plusieurs caractéristiques communes avec les CSH normales âgées, telles qu'une accumulation d'ADN endommagé ou un profil d'expression de molécules associé à un phénotype âgé. Cela suggère que SIRT1 pourrait être impliquée dans le retardement du vieillissement des CSH. De plus, SIRT1 intervient dans la régulation de la spécification de lignée dans les CSH. En effet, la perte de SIRT1 est associée à une anémie et à une expansion significative du compartiment myéloïde, en particulier des progéniteurs granulocytes-monocytes (GMP), au détriment du compartiment lymphoïde⁵⁷⁵.

SIRT3 est un autre régulateur essentiel du vieillissement physiologique des CSH. Cette sirtuine réduit le stress oxydatif en modulant l'acétylation globale des protéines mitochondriales. L'expression de SIRT3 diminue avec l'âge, ce qui contribue à l'augmentation des niveaux de ROS et donc à la détérioration de la fonction des CSH âgées. Il a été démontré que la régulation positive de SIRT3 dans les CSH âgées permettait d'améliorer leur capacité de régénération⁵⁷⁶. L'histone désacétylase SIRT6 est également nécessaire à l'homéostasie des CSH. La délétion de SIRT6 entraîne une hyperprolifération anormale des CSH induite par une activation aberrante de la signalisation WNT. Sur le plan mécanique, SIRT6 réprime la transcription des gènes cibles de WNT en interagissant avec le facteur de transcription LEF1 et en désacétylant l'histone 3 au niveau du résidu lysine 56 (H3K56ac). L'inhibition pharmacologique de la voie WNT permet de corriger la prolifération aberrante et le défaut fonctionnel des CSH déficientes en SIRT6⁵⁷⁷.

Enfin, SIRT7 favorise la capacité de régénération des CSH âgées en dirigeant une branche régulatrice de la réponse mitochondriale aux protéines non pliées (UPRmt, *mitochondrial unfolded protein response*). Il a été suggéré que NFR1 (Nuclear respiratory factor 1), régulateur clé des gènes mitochondriaux, favorise le recrutement de la sirtuine SIRT7 au niveau des promoteurs des gènes codant les protéines ribosomales mitochondriales (mRP) et les facteurs de traduction mitochondriaux (mTF), où elle réprime l'expression des mRPs et des mTFs, et donc l'activité et la prolifération mitochondriales. L'inactivation de SIRT7 au sein des CSH a entraîné une réduction de leur quiescence, une augmentation du stress de repliement des protéines mitochondriales (PFSmt) et perturbé leur capacité de régénération. Les CSH âgées sont caractérisées par une expression de SIRT7 réduite. Aussi, une régulation positive de SIRT7 permet d'améliorer leur capacité de régénération⁵⁷⁸.

IV.2. Les HDAC dans la régulation de l'érythropoïèse

Des études employant des pan-inhibiteurs des HDAC ont montré que les HDAC exercent des fonctions très diverses dans l'érythropoïèse humaine adulte telles que la différenciation ou la survie des précurseurs érythroïdes. En effet, les inhibiteurs FK228 et TSA favorisent la génération de cellules érythroïdes à partir de cellules CD34⁺ dans des cultures contenant de l'IL-3 mais la supprime dans des cultures contenant de l'EPO. De plus, FK228 provoque l'apoptose des cellules érythroïdes CD36⁺GPA^{low/-} et CD36⁺GPA^{high} en présence d'EPO⁵⁷⁹.

IV.2.1. Classe I des HDAC dans la différenciation érythroïde terminale

Plusieurs études indiquent qu'HDAC1 et/ou HDAC2, membres de la classe I des HDAC, sont intégrées dans des complexes impliqués dans la différenciation érythroïde terminale, tels que SIN3A (*Switch-independent 3 family member A*), NuRD (*Nucleosome remodeling and deacetylase*) ou CoREST (*Corepressor of RE1 silencing transcription factor*)^{580,581}.

Le complexe corépresseur Sin3A-HDAC1 est capable d'interagir avec EKLF (*Erythroid Kruppel-like factor*), un facteur de transcription spécifique des cellules érythroïdes qui joue un rôle essentiel dans l'activation du gène de la β -globine⁵⁸². L'acétylation d'EKLF médiée par CBP/p300 favorise son interaction avec le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF, et par conséquent l'activation transcriptionnelle au niveau du promoteur du gène de la β -globine⁵⁸³. Étant donné que le résidu lysine en position 302 (K302) de KLF est essentiel à l'interaction EKLF-Sin3A, il a été postulé que la répression d'EKLF implique sa désacétylation par HDAC1⁵⁸². Dans les cellules érythroleucémiques murines MEL (*murine erythroleukemia*), le recrutement de mSin3A/HDAC1 au niveau du site de liaison de la région IVS2 (*intervening sequence 2*) situé dans l'intron du gène de la β -globine est assuré par la protéine MeCP2 (*methyl CpG binding protein 2*) associée à PU.1. Le complexe MeCP2-PU.1-mSin3A-HDAC se détache de cette région au cours de la différenciation érythroïde des cellules MEL⁵⁸⁴.

De plus, l'acétylation d'HDAC1 joue un rôle régulateur sur l'activité du complexe NuRD. Ce complexe qui contient HDAC1 est nécessaire aux processus d'activation/répression génique médiée par GATA1. Lors du processus d'activation, HDAC1 est acétylée par p300/CBP, ce qui entraîne la perte de son activité désacétylase au sein du complexe NuRD qui exerce alors un effet activateur sur les gènes au cours de la différenciation érythroïde dirigée par GATA1. L'activation des gènes médiée par NuRD est probablement assurée par son activité de remodelage des nucléosomes. Lors du processus de répression, le complexe NuRD peut

désacétyler les histones et remodeler la chromatine en une structure répressive⁵⁸⁵.

Les histones désacétylase HDAC1 et HDAC2 font également partie d'un complexe répresseur qui comprend CoREST, protéine qui se lie au domaine C-terminal du facteur de transcription REST (*repressor element-1 silencing transcription factor*), l'histone déméthylase LSD1 ainsi que les répresseurs transcriptionnels Gfi-1 et Gfi-1b. Gfi-1b, en s'associant à CoREST-LSD1, recrute ces cofacteurs au niveau des promoteurs de plusieurs gènes cibles, ce qui permet ensuite au complexe d'induire la répression transcriptionnelle de ces derniers. L'inhibition de CoREST et de LSD1 perturbe la différenciation des cellules érythroïdes, mégacaryocytaires et granulocytaires ainsi que des progéniteurs érythroïdes primaires. La déplétion de LSD1 dérègle les gènes cibles de Gfi-1/1b selon des schémas spécifiques à chaque lignée et augmente la méthylation H3-K4 des promoteurs cibles de Gfi-1b⁵⁸⁶. Récemment, une isoforme de Gfi-1B essentielle à la différenciation érythroïde a été identifiée : il s'agit de Gfi-1B p32. Générée par épissage alternatif, p32 est capable de recruter CoREST-LSD1 lorsqu'elle est diméthylée sur son domaine SNAG au niveau du résidu lysine 8 (K8). Sa capacité de recrutement est plus grande en comparaison avec l'isoforme p37, bien que son niveau d'expression soit moins élevé. Le knock down sélectif de Gfi-1B p32 perturbe la différenciation érythroïde, tandis que son expression ectopique induit l'érythropoïèse en l'absence d'EPO⁵⁸⁷.

Il est à noter qu'HDAC1 est aussi un coactivateur de l'expression du gène PU.1 impliqué dans les processus d'auto-renouvellement hématopoïétique et de spécification de lignée. Sur le plan mécanistique, HDAC1 désacétyle sa cible TAF9 (*TATA-binding protein-associated factor 9*), composant du complexe TFIID (*transcription factor IID*), ce qui permet à TAF9 de s'associer au promoteur du gène PU.1 et d'activer son expression. Au cours de l'érythropoïèse, il se produit une acétylation d'HDAC1 qui réduit son activité désacétylase et donc favorise la formation de TAF9 acétylé. TAF9 acétylé perd non seulement sa liaison au promoteur, mais entraîne également le désassemblage du complexe TFIID au niveau du promoteur de PU.1, ce qui conduit à la répression transcriptionnelle de PU.1, ce dernier processus étant associé à la différenciation érythroïde terminale⁵⁸⁸⁻⁵⁹⁰.

En outre, HDAC2 est nécessaire à la condensation de la chromatine et à l'énucléation qui en découle. Dans des érythroblastos de fœtus de souris, la régulation négative d'HDAC2 par un shRNA (*short hairpin RNA*) a produit une inhibition significative de la condensation de la chromatine et de l'énucléation²⁵⁵.

IV.2.2. Classe II des HDAC dans la différenciation érythroïde terminale

Une étude conduite par Watamoto et al. a d'abord suggéré qu'HDAC5, membre de la classe IIa des HDAC, pouvait être un régulateur négatif de l'érythropoïèse. Dans les cellules MEL (*Murine erythroleukemia*), HDAC5 est en effet capable d'interagir directement avec GATA1 et une différenciation érythroïde induite par un traitement au N,N'-hexaméthylène bis-acétamide entraîne leur colocalisation dans le noyau. Des tests de gènes rapporteurs ont montré que la co-expression d'HDAC5 peut réprimer l'activité transcriptionnelle de GATA1 et ainsi empêcher la différenciation terminale. De plus, HDAC5 se dissocie de GATA1 pendant la différenciation des cellules MEL⁵⁹¹.

Il a ensuite été démontré qu'HDAC5 agit comme un intermédiaire au sein de la voie de signalisation érythropoïétine-PKD-HDAC5-GATA1 impliquée dans la régulation érythropoïétique⁵⁹². Sur le plan mécanistique, l'EPO déclenche l'activation de la protéine kinase D, qui en phosphorylant probablement HDAC5, favorise la dissociation entre HDAC5 et GATA1 puis l'acétylation subséquente de GATA1, une modification qui pourrait être impliquée dans la programmation transcriptionnelle de l'érythropoïèse^{592,593}. L'interférence avec la signalisation de PKD perturbe la différenciation érythroïde en présence d'EPO, tandis que le knockdown d'HDAC5 augmente la réponse à l'EPO. Les souris dépourvues d'HDAC5 présentent une résistance au risque anémique, une entrée accrue des progéniteurs dans la lignée érythroïde et une capacité de maturation érythroïde indépendante de l'EPO⁵⁹².

Bien qu'HDAC5 ne semble pas posséder d'activité désacétylase intrinsèque, elle pourrait intervenir dans la régulation de l'érythropoïèse par l'intermédiaire du complexe NuRSERY (*nuclear remodeling shuttle erythroid*) dont elle fait partie avec GATA1, EKLF et pERK. HDAC5 est spécifiquement exprimée dans la lignée érythroïde et est capable de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau. Il a été suggéré qu'HDAC5 au sein du complexe NuRSERY a deux fonctions principales : la première fonction consiste à déplacer GATA1 et EKLF depuis le cytoplasme vers le noyau par le biais de NuRSERY et la deuxième fonction fait intervenir le recrutement d'HDAC3 qui désacétyle GATA1 et EKLF dans le noyau. La phosphorylation d'ERK probablement induite par le SCF serait nécessaire à la formation de NuRSERY ainsi qu'à sa localisation nucléaire médiée par l'activité navette d'HDAC5. Au cours de la maturation érythroïde, les niveaux de pERK diminuent fortement. Aussi, NuRSERY favoriserait les premières étapes de la maturation érythroïde⁵⁹⁴.

Plus récemment, Wang et al. ont montré que l'expression d'HDAC5 augmente de façon importante au cours des derniers stades de l'érythropoïèse humaine et que la désacétylation de protéines histones et non-histones par HDAC5 serait en fait nécessaire à la survie, à la

prolifération et à l'énucléation dans les érythroblastes humains. En effet, une déficience en HDAC5 a entraîné une augmentation de l'apoptose et une altération de l'énucléation des érythroblastes. Cette réduction d'HDAC5 a notamment induit une activation de la molécule pro-apoptotique p53 en association avec une acétylation accrue de p53. De plus, dans les érythroblastes de stade tardif, la déficience en HDAC5 ou son inhibition pharmacologique a entraîné une augmentation de l'acétylation de H4 (K12) qui s'est accompagné d'une diminution de la condensation chromatinienne, ce qui implique que la désacétylation de H4 (K12) médiée par HDAC5 jouerait un rôle dans la condensation chromatinienne. Des analyses de séquençage de l'ARN (RNA-seq) ont par ailleurs révélé que l'expression des gènes impliqués dans la division cellulaire et la ségrégation des chromosomes était régulée négativement dans les érythroblastes orthochromatiques déficientes en HDAC5, processus associé à une énucléation déficiente⁵⁹⁵.

HDAC6 de la classe IIb des HDAC, est une autre désacétylase impliquée dans le processus d'énucléation de la différenciation érythroïde terminale. Dans des érythroblastes fœtaux de souris, la désacétylation de mDia2 médiée par HDAC6 favorise la formation du CAR, puis la cytokinèse et l'énucléation. L'inhibition d'HDAC6 pourrait provoquer l'accumulation de mDia2 acétylée, ce qui a pour effet de perturber la formation du CAR et les processus ultérieurs de cytokinèse et d'énucléation. La surexpression de mDia2 non désacétylée corrige le défaut d'énucléation lié à l'invalidation d'HDAC6²⁸⁹.

IV.3. Les HDAC dans la régulation du gène de la γ -globine

Les HDAC de classe I interviennent dans la régulation des gènes de la γ -globine humaine (*h γ*) en interagissant avec des facteurs de transcription spécifiques de la lignée érythroïde.

Par exemple, HDAC1 contribue à la répression de *h γ* médiée par Ikaros au moment du passage de la γ - à la β -globine lors du développement ontogénique. Plus précisément, Ikaros favorise le recrutement au niveau des promoteurs *h γ* d'un complexe de type répressosome contenant les composants du complexe NuRD Mi-2 et HDAC1 ainsi que GATA1 et FOG1. La nucléation des répressosomes, en réduisant l'accessibilité de la chromatine, diminue progressivement la fréquence des interactions chromatinienne à distance entre la région de contrôle du locus (β LCR) et les promoteurs *h γ* . Ce processus entraîne ainsi à terme l'extinction spécifique des gènes *h γ* ⁵⁹⁶.

HDAC1 est également capable d'interagir avec le facteur de transcription NF-E4, un composant d'un complexe protéique qui favorise l'expression préférentielle des gènes de la *huy* dans les cellules érythroïdes fœtales. Une diminution de l'interaction HDAC1/NF-E4 induite par l'acétylation de NF-E4 au niveau du résidu lysine 43 (K43) est potentiellement associée à une augmentation de la capacité d'activation du facteur au niveau des promoteurs *huy*⁵⁹⁷.

En s'associant avec NCOR1 (*Nuclear receptor co-repressor 1*), HDAC3 forme un complexe protéique qui occupe le promoteur de la γ -globine, ce qui lui permettrait de jouer un rôle dans l'extinction développemental des gènes de la globine fœtale. Il a en effet été démontré que le déplacement du complexe HDAC3/NCOR1 induit par un traitement par SCFAD (*Short-chain fatty acids*) favorise le recrutement de l'ARN polymérase II et une augmentation simultanée de l'acétylation des histones H3 et H4 au niveau du promoteur du gène *huy*. Par ailleurs, le knockdown spécifique de l'HDAC3 endogène par siRNA dans les progéniteurs érythroïdes humains entraîne une augmentation de la transcription au niveau des promoteur des gènes *huy*, ce qui démontre que le déplacement d'HDAC3 des promoteurs *huy* par le SCFAD est suffisant pour induire l'expression de *huy*⁵⁹⁸.

Outre son rôle dans la régulation des gènes *huy*, il est à noter qu'HDAC3 est capable de se lier au promoteur du gène de l'hepcidine, hormone clé de la régulation du métabolisme du fer. En conséquence, le complexe HDAC3-NCOR1 est probablement responsable, au moins en partie, de la régulation négative de l'hepcidine. Chez les souris déficientes en fer, une inhibition pharmacologique d'HDAC3 par RGFP966 augmente l'expression de l'hepcidine, et le séquençage de l'ARN confirme que l'hepcidine est l'un des gènes les plus régulés par ce médicament *in vivo*. De plus, le knockdown d'HDAC3 neutralise la suppression de l'hepcidine induite soit par l'érythroferrone, soit par l'inhibition de la signalisation de la protéine morphogénétique osseuse⁵⁹⁹.

Contrairement aux HDAC de classe I citées précédemment, HDAC9, membre de la classe IIa des HDAC, est impliquée positivement dans la régulation des gènes de la γ -globine. En effet, des tests d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) ont montré qu'HDAC9 se lie *in vivo* dans la région située en amont du promoteur du gène de la $G\gamma$ -globine. De plus, le knockdown d'HDAC9 par petit ARN interférant (siRNA pour *small interfering RNA*) dans des progéniteurs érythroïdes primaires humains entraîne une extinction du gène de la γ -globine. À l'inverse, l'expression forcée d'HDAC9 augmente simultanément les niveaux d'ARNm de la γ -globine et de l'HbF. Étant donné que de multiples sites de liaison du facteur de transcription MEF2

(*myocyte enhancer factor 2*) ont été identifiés dans les promoteurs de la γ -globine de la lignée érythroleucémique K562, il a été suggéré que MEF2 pourrait participer au recrutement d'HDAC9 au niveau de ces promoteurs⁶⁰⁰.

IV.4. Rôle d'HDAC6 dans la production des plaquettes

Plusieurs études cliniques associent les HDAC6i tels que le ricolinostat (ACY-1215) ou le citarinostat (ACY-241) utilisés en monothérapie ou en combinaison avec d'autres molécules chimiothérapeutiques dans le traitement du cancer, à la survenue d'une thrombopénie²⁰⁷⁻²¹⁰, ce qui a permis de suggérer que la protéine HDAC6 intervient dans la formation des plaquettes. Les plaquettes sont produites à partir d'un mécanisme qui se déroule en deux étapes successives que sont la mégacaryopoïèse et la thrombopoïèse. Au cours de la mégacaryopoïèse, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) présentes au sein de la moelle osseuse se différencient dans un premier temps en mégacaryoblastes, puis subissent une série d'endomitoses, avant d'aboutir au stade mégacaryocyte (MK), cellule géante au noyau polyploïde. Un système de démarcation de membranes (DMS) en continuité avec la membrane plasmique se développe progressivement dans le cytoplasme. Au cours de la thrombopoïèse, les MK matures émettent des prolongements cytoplasmiques appelés pseudopodes ou proplaquettes (PPT) qui traversent la paroi des sinusoides médullaires et se fragmentent pour libérer dans la lumière de ces derniers, les plaquettes⁶⁰¹⁻⁶⁰³. La fragmentation des MK est régulée par les microtubules (MT) et le cytosquelette d'actine⁶⁰³. Tandis que le glissement des MT favorise l'allongement des PPT⁶⁰⁴, la polymérisation de l'actine joue un rôle essentiel dans la formation du système de démarcation membranaire (DMS)⁶⁰⁵ et la ramification des PPT⁶⁰⁶ (Figure 27).

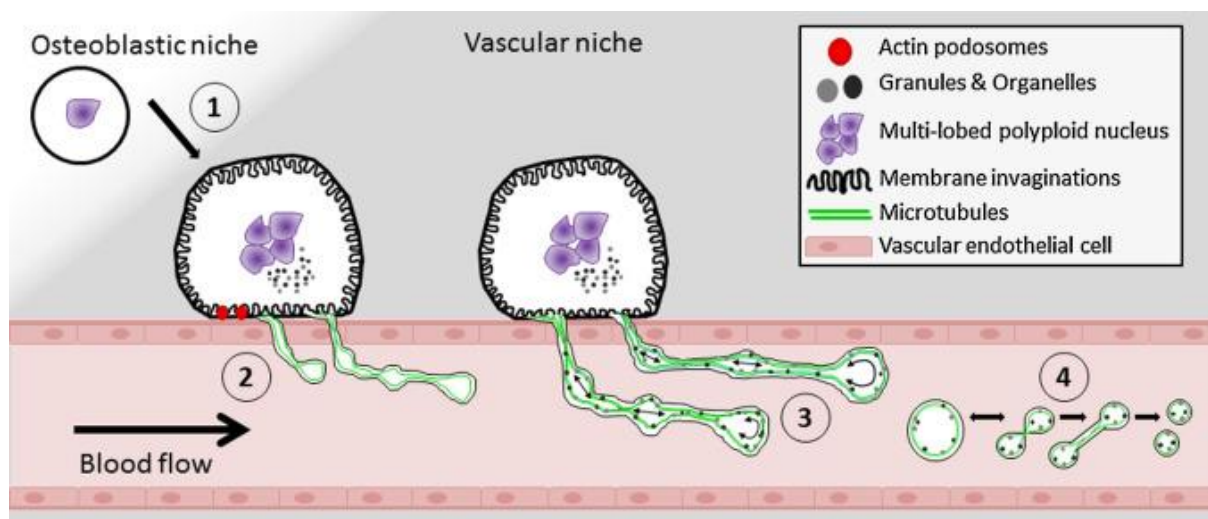


Figure 27. Processus de formation des plaquettes dans la moelle osseuse (d'après Poulter et al. 2015⁶⁰³).

1) Les MK immatures résidant dans la niche ostéoblastique subissent plusieurs cycles d'endomitose qui augmentent leur taille, leur ploïdie et leur contenu membranaire et migrent vers les vaisseaux sinusoidaux de la niche vasculaire. 2) Les MK matures dégradent la lame basale à l'aide de structures d'actine spécialisées appelées podosomes et étendent les proplaquettes dans la circulation sanguine par un processus médié par les microtubules. 3) Les organites et les granules spécifiques aux plaquettes sont transportés vers les plaquettes naissantes via des faisceaux de microtubules bipolaires qui s'étendent sur toute la longueur de la plaquette. 4) Dans la circulation, les proplaquettes donnent naissance aux plaquettes par une torsion du cytosquelette de microtubules puis deux plaquettes individuelles sont formées après un processus de fission potentialisé par les forces de cisaillement.

Les travaux de Messaoudi et al. démontrent que la thrombopénie observée au cours d'un traitement avec un HDAC6i peut être expliquée par l'axe HDAC6-CTTN qui joue un rôle de régulateur positif dans la maturation des MK d'origine humaine¹³⁵ (Figure 28).

La CTTN, protéine monomérique du cytosquelette, intervient dans la polymérisation et le remodelage du cytosquelette d'actine¹⁷⁰. Son activité peut être régulée par des modifications post-traductionnelles ; elle est notamment une cible directe de la désacétylation par HDAC6. Dans des progéniteurs mégacaryocytaires humains, l'invalidation pharmacologique ou génétique d'HDAC6 entraîne *in vitro* une hyperacétylation de la CTTN. Cette hyperacétylation diminue la capacité de la CTTN à se lier à l'actine F, ce qui inhibe ultérieurement sa polymérisation en filaments d'actine et donc la différenciation terminale des MK. L'introduction d'une CTTN mutante qui mime la forme désacétylée (CTTN-9KR) permet de restaurer la dépolymérisation de l'actine et la baisse de formation des PPT. En revanche, l'introduction de la tubuline 40KR, une forme mutante qui mime la tubuline non acétylée n'a pas permis de réverter le déficit de formation des PPT, ce qui suggère que l'acétylation de la

tubuline n'est pas impliquée dans la régulation de ce processus. Ainsi, c'est par l'intermédiaire de son activité désacétylase sur la CTTN que la protéine HDAC6 humaine régule positivement la différenciation terminale des MK et par conséquent la génération des PPT. Il convient de souligner qu'HDAC6 régule la différenciation terminale des MK humains sans impacter significativement les phases précoces de différenciation. En effet, son expression n'est que faiblement détectable en phase précoce dans les cellules CD34+, bien qu'elle augmente fortement durant la mégaryopoïèse¹³⁵. De plus, la thrombopénie induite par un HDAC6i serait plus modérée en comparaison avec celle causée par les pan-inhibiteurs d'HDAC. En effet, ces derniers, en raison de leur manque de sélectivité, altèrent non seulement la mégacaryopoïèse humaine au cours des stades tardifs de la différenciation par des mécanismes qui sont principalement indépendants de p53 et médiés par des modifications du cytosquelette, mais aussi en phase précoce par une augmentation des cassures double-brin de l'ADN et une apoptose dépendante de p53⁶⁰⁷. Il est aussi possible que les effets des pan-inhibiteurs d'HDAC soient dus à l'hyperacétylation des histones au cours des phases précoces.

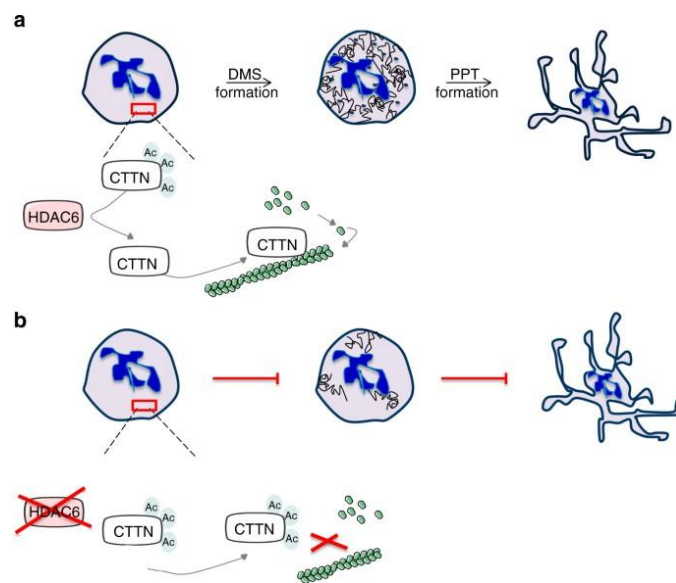


Figure 28. Représentation de la voie HDAC6/CTTN au cours de la formation des plaquettes chez l'homme (d'après Messaoudi et al. 2017¹³⁵).

a) La désacétylation de la CTTN par HDAC6 induit l'assemblage des filaments d'actine nécessaire à la production de plaquettes humaines. b) La répression d'HDAC6 conduit à l'hyperacétylation de la CTTN, à la diminution de sa capacité à se lier à la F-actine et à l'inhibition de son assemblage, ce qui perturbe la différenciation terminale MK.

OBJECTIF DU TRAVAIL

I. Contexte scientifique de l'étude

De nombreuses études ont récemment montré le rôle des modifications post-traductionnelles dans la régulation des processus vitaux tels que la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire. Parmi ces modifications post-traductionnelles, l'acétylation modifie les propriétés physico-chimiques des protéines et module leur activité, leur stabilité, leur localisation ainsi que leur affinité pour d'autres protéines. Cette modification est catalysée par une classe d'enzyme appelée Histone Acétyl-Transférase (HAT). Les Histone Déacétylases (HDAC) catalysent la réaction inverse et permettent de désacétyler les protéines en présence de différents cofacteurs (Zn, NAD)⁶⁰⁸⁻⁶¹⁰.

Chez l'homme, on dénombre 18 HDAC regroupés en fonction de leur homologie structurale en 4 classes. La première classe comporte les HDAC nucléaires capables de désacétyler les histones et les facteurs de transcription (HDAC1, 2, 3 et 8). Les enzymes de la deuxième classe peuvent faire la navette entre les compartiments cytoplasme-noyau et désacétylent également des protéines nucléaires ou cytoplasmiques. Cette classe est subdivisée en deux sous-groupes : la classe IIa comprenant HDAC4, 5, 7 et 9 et la classe IIb composée de HDAC6 et HDAC10. HDAC11 est le seul membre de la classe IV des HDAC⁴⁶.

À travers la désacétylation d'une grande variété de protéines fonctionnelles et structurales, nucléaires et cytoplasmiques, les HDAC modulent d'importants processus cellulaires⁵⁷⁹. Plusieurs travaux ont montré que l'expression et l'activité des HDAC peuvent être altérées dans plusieurs types de cancers où ils stimulent la prolifération et la survie cellulaire et inhibent les processus apoptotiques⁶¹¹. De plus, ils sont impliqués dans la progression tumorale où ils favorisent l'angiogenèse à travers la désacétylation des protéines pro-angiogéniques et des éléments du cytosquelette⁶¹².

Actuellement, différents inhibiteurs des HDAC sont largement évalués au cours d'essais cliniques dans le traitement de plusieurs cancers solides et hématologiques et d'autres pathologies cardiaques et neuro-dégénératives. En dépit de leur haut potentiel anti-tumoral, ils induisent une toxicité hématopoïétique sévère qui, bien que transitoire, limite leur utilisation seuls ou en combinaison avec d'autres inhibiteurs. Cette hématotoxicité se traduit par une anémie, une thrombopénie ainsi qu'une neutropénie dont les mécanismes sont partiellement décrits^{135,613,614}. La mise en évidence du mécanisme responsable de cet effet indésirable permettra ainsi d'améliorer la spécificité ainsi que la sécurité de ces nouveaux agents antinéoplasiques.

II. Objectif

Jusqu'à présent, le rôle de l'histone désacétylase 6 (HDAC6) dans la différenciation érythrocytaire reste peu décrit. HDAC6 appartient aux HDAC de classe IIb. Majoritairement cytoplasmique cette enzyme désacétyle principalement la tubuline, la protéine chaperonne HSP90 et la cortactine. Nos recherches se sont focalisées sur le rôle de cet isoforme compte tenu des résultats rapportés par diverses études cliniques qui associent les inhibiteurs pharmacologiques d'HDAC6 utilisés en monothérapie ou en combinaison avec d'autres molécules chimio-thérapeutiques à la survenue fréquente d'une anémie^{207-213,226}. Par exemple, une étude clinique de phase Ib/II conduite chez 21 patients atteints de lymphomes récidivants et réfractaires a montré que le ricolinostat (ACY-1215), inhibiteur spécifique d'HDAC6, administré sous forme orale à une dose de 160 mg/jour ou 160mg deux fois/jour était généralement bien toléré : la plupart des effets indésirables étaient de grade 1-2, et comprenaient la diarrhée (57 %), les nausées (57 %), la fatigue (43 %), la toux (29%), les vomissements (24%) ainsi que la douleur (19%). Cependant, parmi les effets toxiques de grade 3-4 les plus fréquemment rapportés, figurait l'anémie (9,5 %) dont le mécanisme de survenue reste mal compris²²⁶ (Tableau IV). Chez la souris, l'axe HDAC6-mDia2 est impliqué dans les étapes terminales de l'érythropoïèse, contrôlant la cytokinèse et l'énucléation²⁸⁹. En effet, dans les érythroblastes de souris, la désacétylation de mDia2 par HDAC6 conduit à son activation, à la formation d'un anneau d'actine contractile (CAR) et à la cytokinèse, l'axe HDAC6-mDia2-CAR étant altéré après knockdown ou inhibition d'HDAC6. On ignore cependant si un tel mécanisme se produit également au cours de l'érythropoïèse humaine et s'il est impliqué dans la toxicité érythroïde associée à HDAC6i.

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude est d'étudier l'expression et la fonction d'HDAC6 pendant la différenciation érythroïde *in vitro* des cellules CD34⁺ humaines et de mettre en évidence le mécanisme responsable de l'anémie induite par les inhibiteurs d'HDAC6, ce qui permettrait à terme de moduler la toxicité érythroïde observée lors de l'utilisation de ce type de traitement. À travers cette étude, nous montrons en outre l'implication d'HDAC6 dans la régulation de la voie de signalisation JAK2 opérant en aval de l'activation de l'EPOR, qui est essentielle à la survie, la prolifération et la différenciation des cellules érythroïdes humaines.

ADVERSE EVENTS							
Name	NC/NA, %	Grade 1, %	Grade 2, %	Grade 3, %	Grade 4, %	Grade 5, %	All grades, %
Abdominal pain	86	10	5	0	0	0	14
Alanine aminotransferase increased	90	0	5	0	5	0	10
Anemia	90	0	0	10	0	0	10
Anorexia	86	14	0	0	0	0	14
Aspartate aminotransferase increased	90	0	5	0	5	0	10
Cough	71	19	10	0	0	0	29
Confusion	86	10	5	0	0	0	14
Creatinine increased	86	0	14	0	0	0	14
Dehydration	90	0	10	0	0	0	10
Diarrhea	43	52	5	0	0	0	57
Dyspnea	81	10	5	5	0	0	19
Fatigue	57	33	10	0	0	0	43
Fever	86	10	5	0	0	0	14
Gastrointestinal disorders - Other, specify	90	10	0	0	0	0	10
Headache	86	14	0	0	0	0	14
Hot flashes	90	0	10	0	0	0	10
Hypercalcemia	90	0	0	5	5	0	10
Hyperkalemia	90	10	0	0	0	0	10
Nausea	43	43	14	0	0	0	57
Pain	76	14	5	5	0	0	24
Platelet count decreased	90	5	0	0	5	0	10
Rash maculo-papular	86	5	5	5	0	0	14
Sinus tachycardia	90	10	0	0	0	0	10
Upper respiratory infection	90	0	10	0	0	0	10
Vomiting	76	14	10	0	0	0	24

Tableau IV. Effets indésirables associés au ricolinostat survenus chez plus d'un patient.

Abréviation : NC/NA, no change from baseline/no adverse event (d'après Amengual et al., 2021²²⁶)

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Culture *in vitro* de cellules érythroïdes CD34⁺ humaines et de la lignée cellulaire UT7/EPO

Les cellules progénitrices CD34⁺ ont été isolées avec un kit de sélection positive (MiltenyiBiotec) à l'aide d'un système de tri cellulaire à billes immunomagnétiques (AutoMacs ; MiltenyiBiotec) à partir d'échantillons de leucaphérèse sains, en accord avec notre comité d'éthique institutionnel (Centre Hospitalo-Universitaire d'Amiens). Les cellules CD34⁺ ont été cultivées comme récemment décrit²⁸⁸ du jour (J)1 à J6 dans le milieu IMDM (milieu Iscove modifié Dulbecco) (Biochrom) supplémenté en glutamine (Eurobio), contenant 2% de sérum AB humain (H2B), 100 U/ml de pénicilline (Eurobio), 100 µg/ml de streptomycine (Eurobio), 500 µg/ml d'holo-transferrine humaine (Sigma), 10 µg/ml d'insuline humaine recombinante (Sigma), 2 UI/ml d'héparine (Braun), 100 ng/ml de facteur de cellules souches humaines (SCF) (MiltenyiBiotec) et 3 UI/ml d'érythropoïétine (EPO) (Roche). De J7 à J20, les cellules ont été cultivées dans le même milieu mais sans SCF. Les cellules UT7/EPO ont été maintenues dans un Milieu Essentiel Minimum α (α -MEM) (Dominique Dutscher) complété par 10% de FCS (Eurobio) et 2 UI/mL d'EPO comme décrit récemment⁶¹⁵.

II. Cytométrie en flux

Les cellules ont été lavées et colorées avec des panels appropriés d'anticorps conjugués dans du PBS plus 2 mM EDTA et 0,5% BSA dans la glace. Les anticorps conjugués utilisés sont les suivants : anti-GPA/APC (Miltenyi), anti-CD71/FITC (Miltenyi), anti-Annexine V/APC (Becton Dickinson) et anti-JAK2 (phospho Y1007 + Y1008)/AF647 (Abcam). Dans toutes les conditions, l'exclusion des cellules non viables a été évaluée en utilisant la 7-amino-actinomycine D (7-AAD) ou le DAPI. L'apoptose a été évaluée à l'aide du kit Miltenyi Biotec conformément aux instructions du fabricant. L'acquisition a été réalisée sur un cytomètre en flux MacsQuant et l'analyse effectuée à l'aide du logiciel FlowJo v10.

III. Imagerie en flux

L'imagerie en flux a été réalisée sur ImageStream®X Mark II (Amnis/Luminex) en utilisant le logiciel INPIRE™ (200.1.388.0). 1.106 cellules dans 50µl de PBS 1X ont été marquées avec l'anticorps humain Anti-HDAC6. Les analyses cellulaires ont été réalisées sur au moins 10 000

cellules au grossissement X60. Les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel IDEAS™ (6.2.64.0).

IV. Production de particules lentivirales et transduction des cellules UT7/EPO

Les ShRNA dirigés contre HDAC6, décrits utilisés dans un rapport précédent, ont été offerts par le Dr Najet Debili (IGR, INSERM)⁶¹⁶. La production virale et la transduction cellulaire ont été réalisées comme décrit récemment⁶¹⁷. Les cellules UT7/EPO ont été infectées en utilisant une MOI de 10 ; les cellules ont été lavées 2 fois dans du PBS 1X 48 heures après la transduction et les cellules positives pour la GFP ont été triées en utilisant un FACS Aria II (Becton Dickinson).

V. Immunoblots

Les cellules ont été récoltées à un million par ml par condition, lavées dans du PBS 1X et lysées dans la glace dans un tampon RIPA (Sigma) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (ThermoFisher). Les lysats ont été soumis à une sonication, centrifugés et la concentration en protéines a été quantifiée en utilisant le test de Bradford (Interchim). Après réalisation des procédures standard d'électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide, de transfert sur membrane de nitrocellulose et de blocage avec du lait écrémé à 5%, le transfert a été effectué en utilisant des anticorps primaires dilués au 1/1000 (Tableau V). Les anticorps primaires liés ont été détectés en utilisant un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de Raifort anti-souris (Sigma) ou anti-lapin (ThermoFisher). La révélation a été effectuée par substrat chimioluminescent amélioré (ThermoFisher) et les signaux ont été visualisés à l'aide du dispositif Chemidoc (BioRad).

Anticorps primaires	Espèces des anticorps	Références
Anti-GAPDH	Souris	Santacruz (32233)
Anti-Actine	Souris	Sigma (A1978)
Anti-Tubuline α acétylée	Souris	Santacruz (23950)
Anti-Tubuline α	Souris	Santacruz (5286)
Anti-Histone H3 acétylée	Souris	Santacruz (56616)
Anti-Histone H3	Souris	Santacruz (517576)
Anti-HDAC6	Souris	Santacruz (28386)
Anti-GATA1	Lapin	Abcam (173816)
Anti-HSP90	Souris	Santacruz (13119)
Anti-Survivine	Souris	Santacruz (17779)
Anti-P-JAK2 (Y1007/1008)	Lapin	Cellsignaling (3771S)
Anti-JAK2	Lapin	Cellsignaling (3230S)
Anti-P-STAT5 (Y694)	Lapin	Cellsignaling (9351S)
Anti-P-STAT5 a/b (S726)	Lapin	Santacruz (12893-R)
Anti-STAT5	Souris	Bd Biosciences
Anti-P-ERK1/2 (T202/Y204)	Lapin	Cellsignaling (4370S)
Anti-ERK1/2	Lapin	Cellsignaling (4695S)
Anti-14-3-3	Souris	Santacruz (1657)
Anti-LNK	Souris	Santacruz (393709)
Anti-Lysine acétylée	Lapin	Cellsignaling (9814)

Anticorps secondaires	Espèces des anticorps	Références
Anti-Souris	Chèvre	Santacruz (2005)
Anti-Lapin	Chèvre	Santacruz (2301)

Contrôle d'isotype	Références
igG de Souris	Santacruz (2025)
igG de Lapin	Abcam (37415)

Tableau V. Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour les expériences de WB ou de coIP et des anticorps utilisés en contrôle d'isotype.

VI. Extraction des protéines pour les expériences d'immunoprécipitation

Les cellules ont été lysées dans la glace dans un tampon IP (1% NP40, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 65 mM Tris HCl pH 8, 50 mM HEPES, 3% glycérol, 1 mM orthovanadate, 10 mM butyrate de sodium, 1% Cocktail d'inhibiteurs de phosphatase et 1% Cocktail d'inhibiteurs de protéase) pendant 20 min. Les lysats cellulaires ont également été soumis à sonication trois fois puis homogénéisés avec un mélangeur rotatif (VWR®). Après centrifugation des lysats cellulaires à 10 000 tours/minute pendant 15 min à 4°C, les surnageants ont été recueillis et les concentrations de protéines ont été déterminées par des tests colorimétriques (NanoPhotometer® Pearl).

VII. Immunoprécipitation, acétylation et analyse des interactions protéine-protéine par immunoblot

L'acétylation des protéines et les interactions protéine-protéine ont été étudiées par des expériences d'immunoprécipitation (IP). Les lysats cellulaires ont été incubés avec un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt ou un anticorps témoin IgG (2 µg) pendant une nuit à 4°C. Le jour suivant, les immunocomplexes ont été incubés avec 50 µl de microbilles µMACS Protein G (Miltenyi) pendant 45 min à 4°C. Les immunocomplexes marqués magnétiquement ont ensuite été isolés dans des µColonnes (Miltenyi) selon les instructions du fabricant. Ensuite, un immunoblotting a été réalisé pour détecter et caractériser le statut d'acétylation de la protéine d'intérêt ou pour identifier ses protéines partenaires au sein du même complexe.

VIII. Enrichissement des protéines acétylées par immunoprécipitation pour l'analyse des acétylomes par spectrométrie de masse

Afin de constituer les acétylomes, les lysats cellulaires ont d'abord subi une étape de nettoyage (*preclearing*) avec des anticorps de contrôle IgG (1 µg) en présence de 20 µl de billes de protéine G PLUS-Agarose (sc-2002) pendant 30 min à 4°C. Après centrifugation des lysats cellulaires à 2 500 RPM pendant 5 min à 4°C, les surnageants ont été récoltés.

Les lysats nettoyés ont été incubés avec des anticorps anti-acétyl lysine (1/100) et 20 µL de billes de protéine G PLUS-Agarose (sc-2002) pendant une nuit à 4°C sous agitation douce. Ensuite, les immunocomplexes associés aux billes d'agarose ont été collectés par centrifugation à 2500 RPM pendant 5 min à 4°C, lavés quatre fois dans du PBS, remis en suspension dans du tampon d'électrophorèse 1X, puis chauffés à 95°C pendant 2 min. Par la suite, les échantillons ont migré dans des gels d'électrophorèse à 200V pendant 20 min, et les gels ont été fixés dans

une solution de fixation (50% de méthanol et 10% d'acide acétique glacial) pendant 3 h. Après trois lavages à l'eau, les gels ont été colorés avec du bleu brillant G (Sigma-Aldrich), pendant une nuit à 4°C sous agitation douce. Le jour suivant, les gels ont été décolorés avec une solution de décoloration (40 % de méthanol et 10 % d'acide acétique glacial) et envoyés à la plateforme d'analyse protéomique PAPPSO.

IX. Etude des niveaux de phosphorylation des protéines par immunoblot ou cytométrie en flux

Afin d'étudier les niveaux de phosphorylation des protéines, les cellules ont été privées d'EPO et de SVF pendant une nuit et restimulées le lendemain avec de l'EPO pendant environ 5 à 20 min, avant la lyse cellulaire. Pour l'immunoblotting, la détection des protéines phosphorylées a d'abord été réalisée avant l'élimination des anticorps primaires et secondaires à l'aide d'un tampon de stripping (Restore™ Western Blot Stripping Buffer, Thermofisher) qui doit permettre de nouvelles hybridations d'anticorps sur la même membrane, selon les instructions du fabricant. Ensuite, les membranes strippées ont été réutilisées pour détecter les protéines totales correspondantes.

X. RQ-PCR

L'ARN total des cellules fraîches a été isolé, traité avec la DNase I, en utilisant le RNeasy Mini Kit de Qiagen. La quantité d'ARN a été déterminée avec le spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Pour chaque échantillon, 500 ng d'ARN ont été soumis à une réaction de transcription inverse (Reverse Transcription Kit, Thermofisher). Les niveaux d'expression géniques ont été mesurés par PCR en temps réel en utilisant des sondes Taqman (Thermofisher) et le test Power SYBR green (Thermofisher). Les séquences d'amorces sont indiquées dans le Tableau VI. Les expériences ainsi que le réglage des courbes de dissociation ont été réalisées à l'aide du dispositif de détection Quant Studio 7 (Applied Biosystems). La méthode comparative C_T a été utilisée pour la quantification de l'expression des gènes.

Gènes	Amorces 5' -> 3'
GAPDH-FOR GAPDH-REV	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA CTTGACGGTGCCATGGAATT
HDAC6-FOR HDAC6-REV	TGGCTATTGCATGTTCAACCA GTCGAAGGTGAACTGTGTTTCCT
GPA-FOR GPA-REV	GGGGTGATGGCTGGTGTTAT CACGTCTGTGTCAGGTGAGG
GATA1-FOR GATA1-REV	AGCAGCTTCCTCCACTGC TGGGTACACCTGAAAGACTGG
GATA2-FOR GATA2-REV	TACAGCAGCGGACTCTTCC CTCGTTCCTGTTTCAGAAGGC
EPOR-FOR EPOR-REV	ATCCTGACGCTCTCCCTCAT GAGGCCTTCAAACCTCGCTCT
HBA1-FOR HBA1-REV	GGTCAACTTCAAGCTCCTAAGCC AAGAAGCATGGCCACCGAGG
HBB-FOR HBB-REV	CAACGTGCTGGTCTGTGTG CAGCAAGAAAGCGAGCTTAGTG
ALAS2-FOR ALAS2-REV	AGGATGTGTCCGTCTGGTGTA TGAAACTTACTGGTGCCTGAGA
RPS19-FOR RPS19-REV	CGCGAGCTGCTTCCACA TCCACCATTTTCAGCCCCTC
KLF1-FOR KLF1-REV	TGACTTCCTCAAGTGGTGGC GGTGAGGAGGAGATCCAGGT
KIT-FOR KIT-REV	CCCACCCTGGTCATTACAGAA TACTATCGCTGCAGGAAGACTC
ERFE-FOR ERFE-REV	TGCTCATCTGCATCCAGTCC TTGTCCAAGAACACGGAGGTC

Tableau VI. Liste des amorces pour la RQ-PCR

Toutes les paires d'amorces ont été conçues pour couvrir les zones limites exon-exon en utilisant l'outil Primer Blast, achetées chez Eurogentec et validées pour leur spécificité.

XI. Cytospin pour cytologie, microscopie en immunofluorescence

50.10³ cellules ont été cytopsinées (Cytospin3, Shandon) sur des lames de verre (Matsunami). L'analyse cytologique a été réalisée après coloration au May-Grünwald Giemsa (MGG) (Sigma) selon les instructions du fabricant. Pour la microscopie en fluorescence, 50.10³ cellules ont été

fixées avec 1% de paraformaldéhyde (PFA, Thermofisher), perméabilisées (Triton X100 0,1%, Sigma), lavées par centrifugation (1500 RPM, 5 min) et resuspendues dans 100 µl de PBS- 5% BSA. Les cellules ont été incubées pendant une nuit à 4°C avec un anticorps primaire de souris anti-HDAC6 (1/100, sc-28386) ou un anticorps primaire de lapin anti-GATA1 (1/200, ab173816), puis lavées par centrifugation (1500 RPM, 5 min) et resuspendues dans 100 µl de PBS- 5% BSA. Le marquage a été réalisé avec un anticorps anti-souris Alexa Fluor® 647 (Thermofisher, A-21235) ou un anticorps anti-lapin Alexa Fluor® 647 (Thermofisher, A-21244) à température ambiante pendant 1 h. Après un lavage doux suivi d'une cytopspinisation (300 g, 5min), les érythroblastes fixés sur une lamelle ont été montés sur des plaques de verre en utilisant le produit de montage ProLong Gold Antifade Mountant avec DAPI (Thermofisher). Les images ont été obtenues à l'aide d'un microscope Axio Imager M2 ApoTome associé au logiciel ZEN (Zeiss, France).

XII. Réactifs

L'inhibiteur pharmacologique spécifique d'HDAC6 ACY-1215 a été obtenu auprès de Selleckchem®. Les dilutions ont été préparées dans du diméthylsulfoxyde (DMSO).

XIII. Séquençage de l'ARN

Le séquençage et l'analyse bioinformatique ont été réalisés par la plateforme marseillaise Genomics and Bioinformatics (GBiM) du laboratoire de génétique médicale U1251.

L'ARNm-Seq a été réalisé sur des échantillons d'ARN total provenant de cellules érythroïdes primaires à J10 de différenciation, avec ou sans exposition à l'ACY-1215 (en triplicata).

Avant le séquençage, la qualité des échantillons d'ARN total a été évaluée à l'aide du bioanalyseur Agilent (Agilent, États-Unis) : seuls les ARN dont la valeur du RIN (*RNA Integrity Number*) était supérieure à 8 ont été jugés aptes au séquençage et utilisés pour la préparation de la bibliothèque. Pour chaque échantillon, une bibliothèque de brins ARNm a été préparée à partir de 500 ng d'ARN total après capture des molécules d'ARN comportant une queue poly(A), à l'aide du kit Kapa mRNA HyperPrep (Roche, Suisse) employé selon les instructions du fabricant. Les bibliothèques indexées ont été regroupées et séquencées par la plateforme Illumina NextSeq 500 (séquençage en paires de 75 pb).

XIV. Traitement des données et analyse d'expression différentielle des gènes (DGE)

La qualité des données de séquençage lues a été évaluée à l'aide de fastQC¹. Les données brutes de séquençage ont été alignées sur le génome de référence humain (assemblage du génome d'Homo Sapiens GRCh38 (hg38)) à l'aide de STAR v2.5.3a² et les fichiers bam ont été indexés et triés à l'aide de Sambamba v0.6.6³. Après cartographie, Stringtie (v1.3.1c) a compté les reads alignés sur les gènes définis (annotations GENCODE v34)⁴.

L'analyse de l'expression différentielle des gènes a été réalisée par un test de Wald à l'aide du logiciel DESeq2⁵. Les valeurs P ont été ajustées pour les tests multiples en utilisant la méthode de Benjamini et Hochberg⁶ : seuls les transcrits dont la valeur p ajustée (FDR, False Discovery Rate) était inférieure à 0,05 ont été considérés comme significativement exprimés de manière différentielle. Les gènes exprimés de manière différentielle ont été visualisés sous la forme de cartes thermiques générées à l'aide du logiciel R Pheatmap, ou de volcano plots, représentant le Log₂FC (log₂ du fold change) et la valeur p ajustée, réalisés à l'aide du logiciel R EnhancedVolcano.

L'enrichissement (Gene set enrichment Analysis, GSEA) et la surreprésentation (Singular Enrichment Analysis, SEA) de l'annotation des termes GO dans les DEG ont été réalisés en utilisant respectivement un test de Mann-Whitney et un test hypergéométrique, à l'aide du logiciel R ClusterProfiler. Les résultats de la GSEA et de la SEA ont été représentés, pour un ensemble d'annotations GO sélectionnées, sous la forme d'un Circos plot avec le logiciel R GOplot.

XV. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant la valeur p bilatérale et les tests paramétriques. La signification statistique utilisée était $\alpha = 0,05$. Pour les variables quantitatives, nous avons utilisé le test t de Student ou le test ANOVA à sens unique et l'analyse post-hoc de Tukey pour les analyses multiparamétriques. Toutes les valeurs numériques sont des valeurs moyennes \pm SEM.

RÉSULTATS

I. HDAC6 est exprimée et localisée dans le cytoplasme des cellules érythroïdes pendant la différenciation érythroïde humaine *in vitro*

Nous avons utilisé un modèle précédemment publié de différenciation érythroïde *in vitro* de cellules CD34⁺ issues du sang périphérique de donneurs sains et purifiées par aphérèse⁶¹⁸ (Figure 29A). Nous avons d'abord quantifié l'expression d'HDAC6 de manière séquentielle au cours de la différenciation érythroïde. Nous avons observé une augmentation progressive de l'expression de l'ARN d'HDAC6 du Jour (J) 11 à J18 (Figure 29B). Au niveau protéique, nous avons observé une augmentation précoce de l'expression d'HDAC6 à J6 de la différenciation, suivie d'une diminution progressive au cours des stades tardifs de la différenciation (Figure 29C). Ce profil d'expression et l'apparente discordance entre le niveau de l'ARN et celui des protéines sont en accord avec les données protéomiques de l'érythropoïèse humaine publiées par Gautier et al.⁶¹⁹. Nous avons ensuite évalué la localisation cellulaire d'HDAC6 pendant la différenciation érythroïde des cellules CD34⁺ humaines par les techniques d'immunofluorescence indirecte et d'imagerie en flux. Comme le montre la Figure 29D, nous avons observé que l'expression d'HDAC6 était principalement cytoplasmique à J8, ce qui plaide en faveur de cibles non-histones et cytoplasmiques à cette étape de l'érythropoïèse.

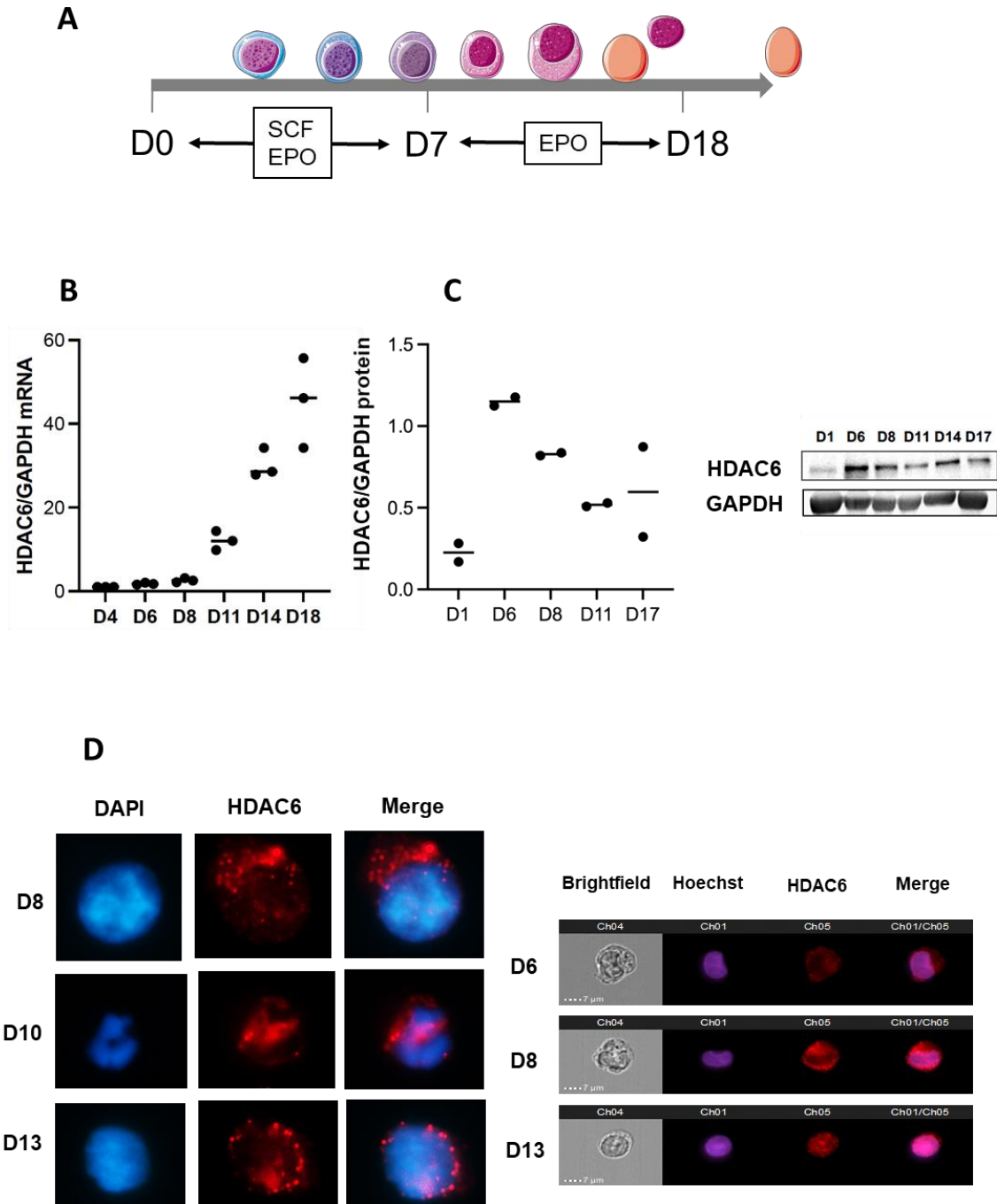


Figure 29. HDAC6 est exprimé au cours de la différenciation érythroïde humaine et est localisée dans le cytoplasme des cellules érythroïdes

A : Schéma représentant le protocole de différenciation érythroïde in vitro utilisé dans cette étude

B : RQ-PCR montrant l'expression d'HDAC6 à différents moments de la différenciation érythroïde in vitro des cellules CD34⁺ issues de l'aphérèse (n=3).

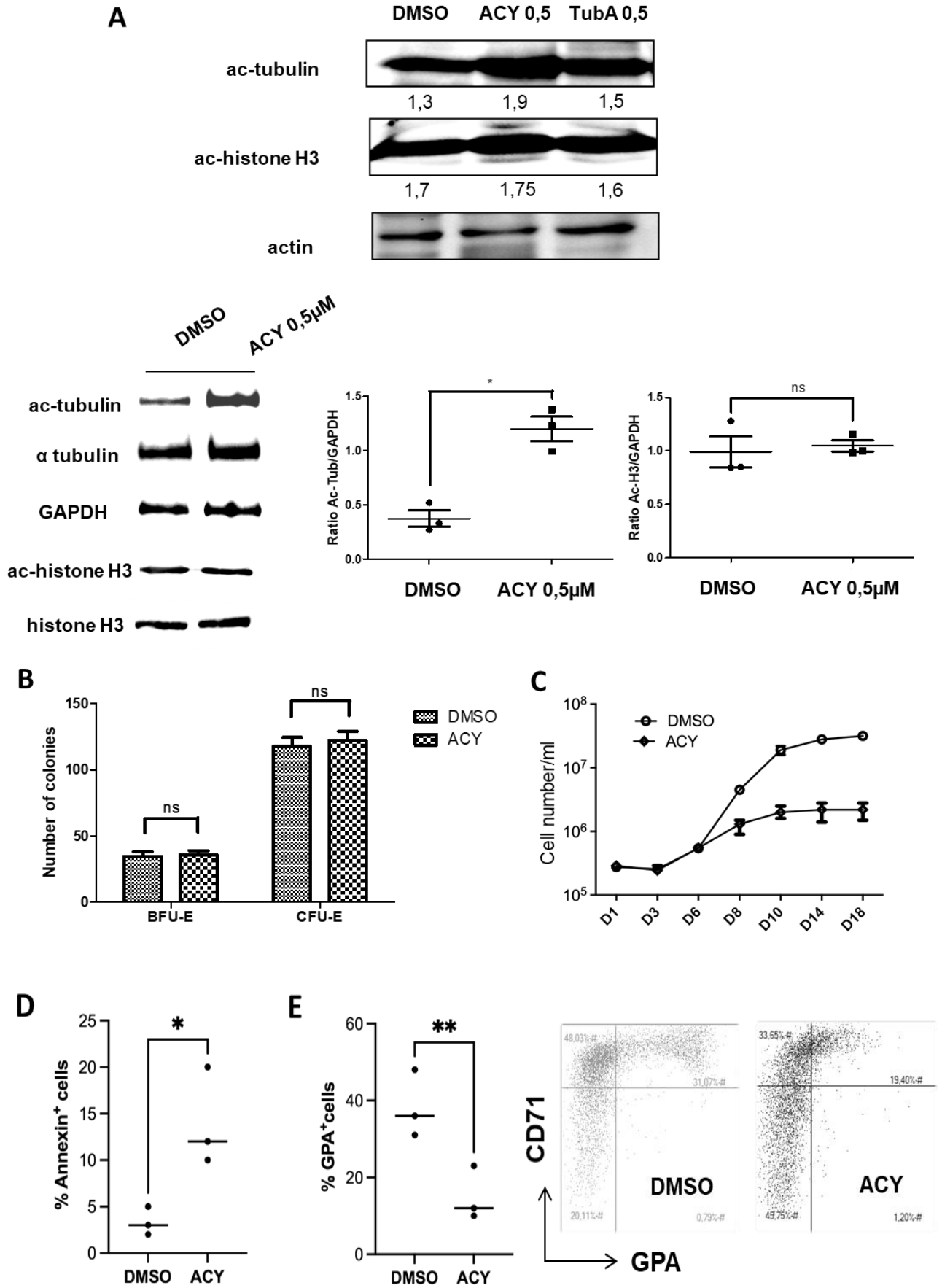
C : Quantification de l'expression de la protéine HDAC6 par analyse Western Blot en utilisant le même essai de différenciation (n=2).

D : Localisation d'HDAC6 dans les cellules érythroïdes primaires à J6, J8, J10 et J13 de la différenciation in vitro par immunofluorescence (à gauche, n=3) et par imagerie en flux (à droite, n=1).

II. Effets d'une inhibition pharmacologique d'HDAC6 sur la différenciation érythroïde humaine *in vitro*

Nous avons cultivé des cellules CD34⁺ dirigées *in vitro* vers la différenciation érythroïde en présence de deux inhibiteurs pharmacologiques d'HDAC6 : ACY-1215 (également connu sous le nom de Ricolinostat) et Tubastatine A de J6 à J10. Nous avons d'abord évalué la spécificité des HDAC6i par Western blot en évaluant le niveau d'acétylation de la tubuline (cible primaire d'HDAC6), et leur sélectivité par le niveau d'acétylation de l'histone H3 (cible des HDAC de classe I). Nous avons observé que 0,5µM d'ACY-1215 donnait un meilleur résultat en termes d'inhibition d'HDAC6 en comparaison avec la tubastatine, conduisant à une augmentation de la tubuline acétylée sans affecter significativement l'acétylation de l'histone H3 (Figure 30A). Nous avons donc utilisé 0,5µM d'ACY-1215 pour les expériences suivantes. Lorsque les cellules CD34⁺ dirigées vers la différenciation érythroïde ont été exposées à l'ACY-1215, l'inhibition pharmacologique d'HDAC6 n'a pas affecté le potentiel clonogénique érythroïde des progéniteurs (Figure 30B).

Ajouté à J6, l'ACY-1215 a significativement diminué le nombre de cellules à J8 et J10 (Figure 30C) et augmenté le taux d'apoptose comme le montre la coloration de l'Annexine V (Figure 30D). Nous avons évalué les effets de l'inhibition d'HDAC6 sur la différenciation érythroïde en utilisant la cytométrie en flux (coloration CD71/GPA) et la cytologie. Nous avons observé à J10 un retard dans la différenciation érythroïde avec un pourcentage réduit de cellules exprimant fortement la Glycophorine A (GPA^{high}) (Figure 30E). Ce retard de différenciation a entraîné une diminution de la quantité d'hémoglobine avec un culot cellulaire restant encore faiblement rouge à J10 (Figure 30F). Aussi, la coloration MGG a révélé une accumulation d'érythroblastes immatures (Pro-E+Ebaso) au détriment des érythroblastes matures (Poly-E+Ortho-E) (Figure 30G).



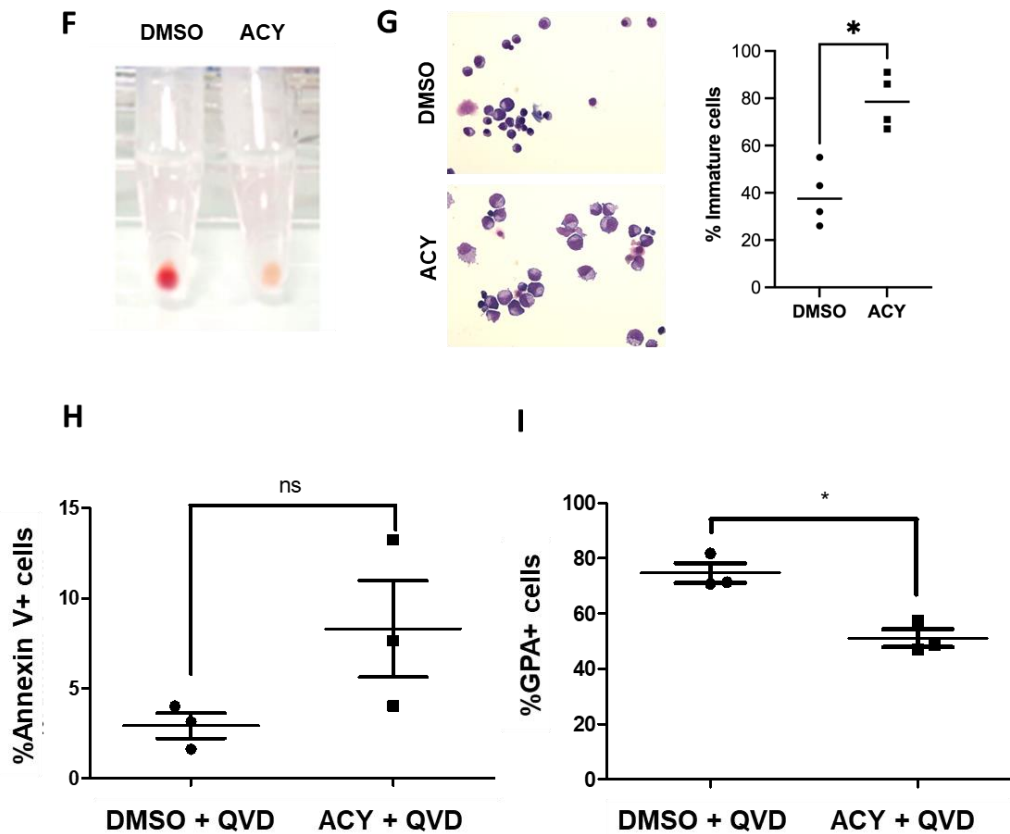


Figure 30. Effets de l'inhibiteur pharmacologique d'HDAC6 (ACY-1215) sur les cellules primaires érythroïdes in vitro.

A : Immunoblots représentatifs montrant le niveau d'acétylation de l'Histone H3 (utilisé comme contrôle négatif car il ne s'agit pas d'une cible d'HDAC6) et de l' α -tubuline (contrôle positif, car il s'agit d'une cible cytoplasmique connue d'HDAC6) après exposition à l'ACY-1215 ou à la tubastatine A, deux HDAC6i, dans des cellules érythroïdes primaires humaines (n=3).

B : Effet de l'inhibiteur d'HDAC6, ACY-1215 à 0,5 μ M, par rapport au DMSO sur l'activité clonogénique des progéniteurs érythroïdes. Aucune différence dans le nombre de BFU-E et de CFU-E n'a été observée (n = 3).

C : Courbes comparatives de prolifération de cellules primaires humaines cultivées dans un milieu de différenciation érythroïde et exposées à 0,5 μ M d'ACY-1215 ou au DMSO, n=3.

D : Augmentation de l'apoptose à J10 chez les progéniteurs érythroïdes exposés à 0,5 μ M d'ACY-1215 en comparaison avec le DMSO : % de cellules Annexine V⁺ DMSO vs. ACY : 3,33(\pm 1,5) vs. 14(\pm 5,3) ; n=3 ; p<0,05.

E : Diminution du pourcentage de cellules GPA^{high} à J10 de la différenciation érythroïde évaluée par CMF après exposition à 0,5 μ M d'ACY-1215 vs. DMSO. À droite : Dot plot CD71/GPA obtenu à J10 dans une expérience représentative. % de cellules GPA^{high} à J10 DMSO vs. ACY : 38% (\pm 8,7) vs. 15% (\pm 7) ; n=3 ; p<0,01.

F : Photos du concentré érythrocytaire obtenu à J10 après exposition au DMSO et à 0,5 μ M d'ACY-1215 (une expérience représentative, n=4)

G : Cytospin après coloration au May Grünwald Giemsa montrant la morphologie des érythroblastes à J10 après exposition au DMSO et à 0,5 μ M ; les cellules immatures sont identifiées par * ; à gauche :

image d'une expérience représentative ; à droite : histogrammes montrant le % d'érythroblastes immatures (ProE+ E Baso) dans les deux conditions : DMSO vs. ACY-1215 : 39% ($\pm 12,8$) vs. 78,7% ($\pm 11,6$) ; n=4 ; p<0,05.

H : Taux d'apoptose à J10 en présence d'un inhibiteur de l'apoptose (QVD) chez les progéniteurs érythroïdes exposés à 0,5 μ M d'ACY-1215 en comparaison avec le DMSO : % de cellules Annexine V + DMSO+QVD vs. ACY+QVD : 2,91($\pm 1,21$) vs. 8,29($\pm 4,60$) ; n=3 ; ns

I : Diminution du pourcentage de cellules GPA^{high} à J10 de la différenciation érythroïde évaluée par CMF après exposition à 0,5 μ M d'ACY-1215+QVD vs. DMSO+QVD : 74,6% ($\pm 6,10$) vs. 51,10% ($\pm 5,77$) ; n=3 ; p<0,05.

III. Le retard de maturation érythroïde induit par l'exposition à l'ACY-1215 n'est pas dû à un excès d'apoptose, se produit au niveau transcriptomique et est associé à une modification globale du transcriptome des cellules érythroïdes

Comme le montrent les Figure 30D et E, l'ACY a induit une augmentation de l'apoptose des précurseurs érythroïdes et un retard dans leur maturation à J10. Afin de vérifier que le faible pourcentage de cellules GPA^{high} n'est pas dû à une apoptose sélective de ces érythroblastes immatures, nous avons cultivé des cellules érythroïdes en présence de 0,5 μ M ACY-1215 avec ou sans inhibiteur de pan-caspase QVD. Nous avons observé en condition QVD+ACY-1215 une diminution du taux d'apoptose mais la persistance d'une diminution statistiquement significative des cellules GPA^{high}, ce qui soutient l'hypothèse que le retard de maturation érythroïde observé sous ACY n'est pas dû à un excès d'apoptose des progéniteurs matures (Figure 30H et I).

En raison de la localisation cytoplasmique prédominante d'HDAC6 à J8 de la maturation érythroïde *in vitro* (Figure 29D), nous avons voulu savoir si la GPA pouvait être une cible potentielle non-histone qui serait impactée post-traductionnellement par l'ACY-1215. En réalisant une RQ-PCR, nous avons cependant observé que, dans les cellules primaires, la diminution de la GPA se produisait au niveau de l'ARN (Figure 31A).

En effectuant une analyse RQ-PCR pour évaluer l'expression des gènes érythroïdes clés, nous avons observé après l'exposition à l'ACY-1215 une signature « immature » avec une augmentation de l'expression du gène de GATA2, impliqué dans la phase proliférative précoce et une diminution de l'expression des gènes associés à la différenciation érythroïde tardive comme les gènes de globine, de l'EPOR et de GATA1 (Figure 31A). Le ratio GATA2/GATA1, un marqueur de l'équilibre entre les phases de prolifération précoce et de différenciation tardive, a augmenté après l'inhibition d'HDAC6 (Figure 31B). L'expression protéique de GATA1 était également légèrement réduite (Figure 31C).

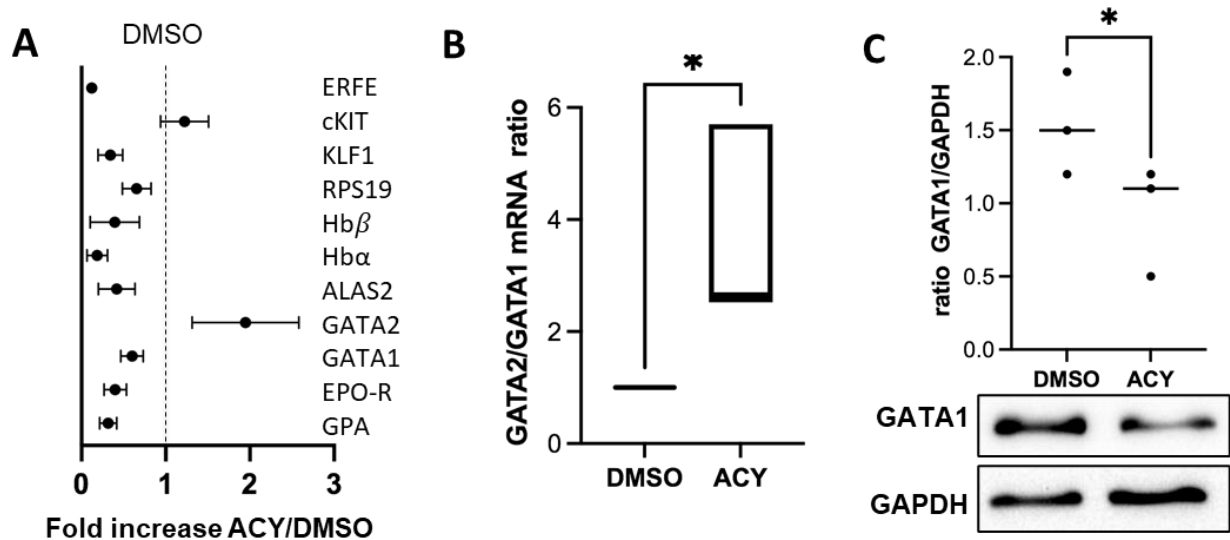


Figure 31. Étude transcriptionnelle dans les cellules érythroïdes primaires.

A : Expression de GATA1, GATA2 et de quelques gènes cibles de GATA1 en ARNm dans les cellules primaires érythroïdes primaires traitées avec ACY0,5 μ M (n=4).

B : Expression en ARNm de GATA2 rapportée sur celle de GATA1 dans les cellules primaires traitées avec ACY0,5 μ M (n=4).

C : Diminution de la quantité protéique de GATA1 évaluée par Western blot dans les cellules érythroïdes primaires exposées à ACY-1215 par rapport au DMSO utilisé comme contrôle, ratio GATA1/GAPDH, DMSO vs. ACY : 1,5 (\pm 0,35) vs. 0,9 (\pm 0,37) ; n=3 ; p<0,05.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Graphpad®, avec un test de comparaison mutiple ANOVA à 2 voies (Sidak) ou un test de Student. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type. Les différences sont considérées comme significatives lorsque la valeur P est inférieure à 0,05.

Afin de mieux comprendre les modifications transcriptomiques induites par l'ACY-1215, nous avons réalisé une analyse RNA-Seq (*RNA sequencing*) sur des érythroblastes à J10 exposés à 24h d'HDAC6i ou de DMSO. Nous avons observé 1920 DEG (*Differentially Expressed Genes*) dont 1134 régulés positivement et 786 régulés négativement (Figure 32A et B). L'analyse en composantes principales (ACP) a clairement séparé les cellules exposées à l'ACY-1215 de celles exposées au DMSO, indiquant que l'inhibition d'HDAC6 induit un schéma d'expression distinct (Figure 32C). L'analyse GSEA basée sur les rangs a montré (i) un enrichissement significatif de gènes régulés négativement liés aux érythroblastes de la moelle osseuse, ainsi que de gènes sous-exprimés impliqués dans le métabolisme de l'hème, puis en cohérence avec les résultats obtenus par q-RT-PCR, (ii) un enrichissement significatif de gènes régulés négativement, cibles de GATA1 ou d'E2F et (iii) un enrichissement significatif de gènes sous-exprimés liés au cycle cellulaire (Figure 32D).

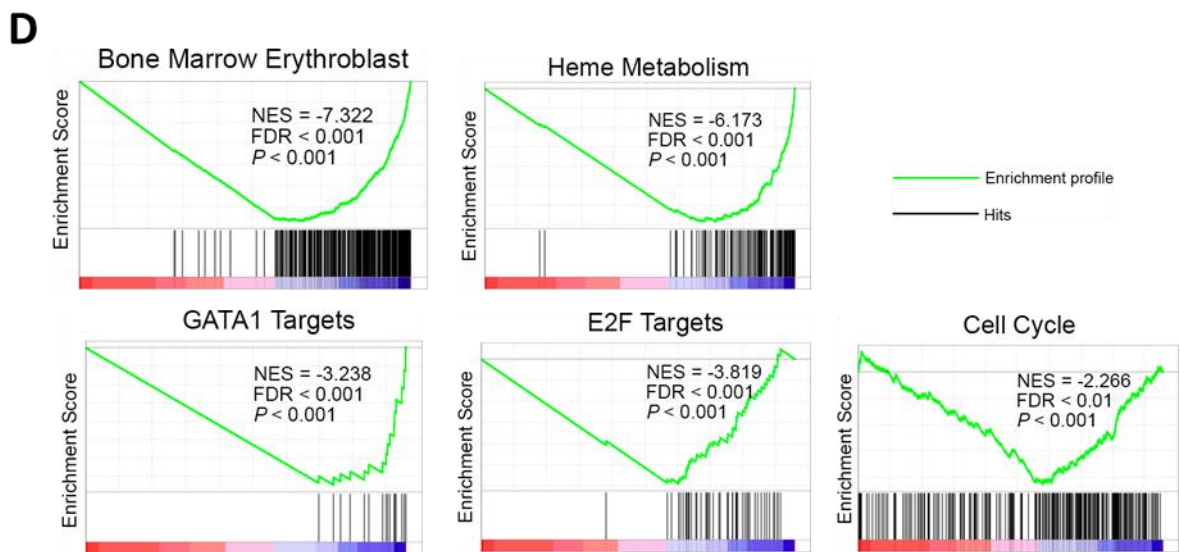
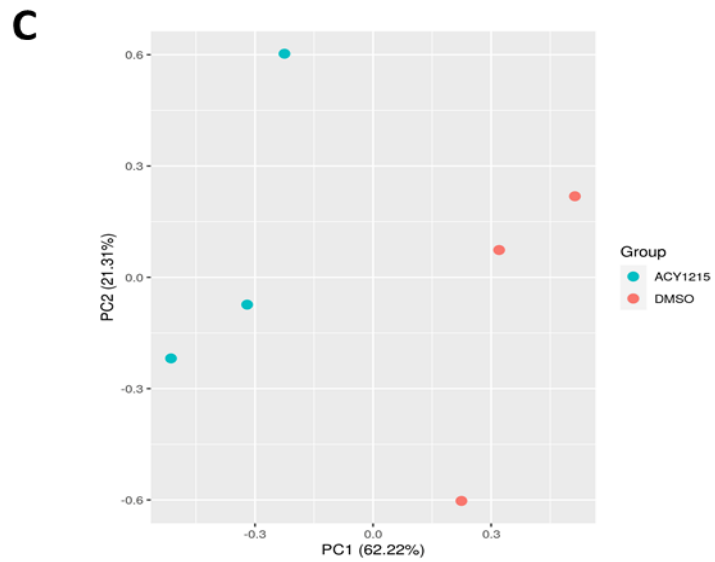
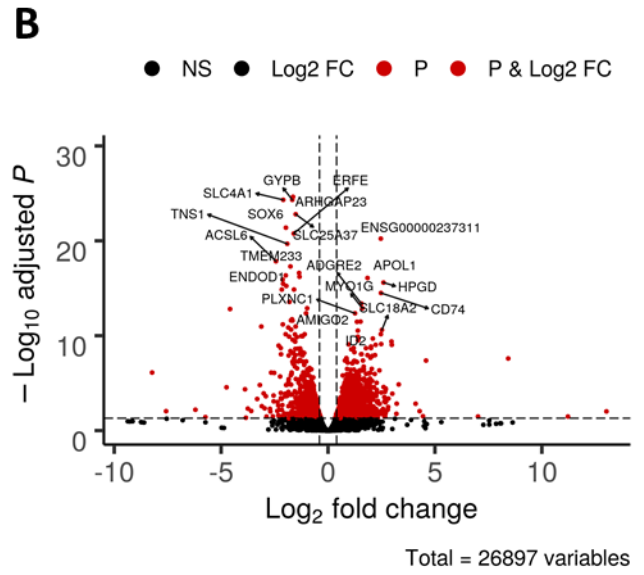
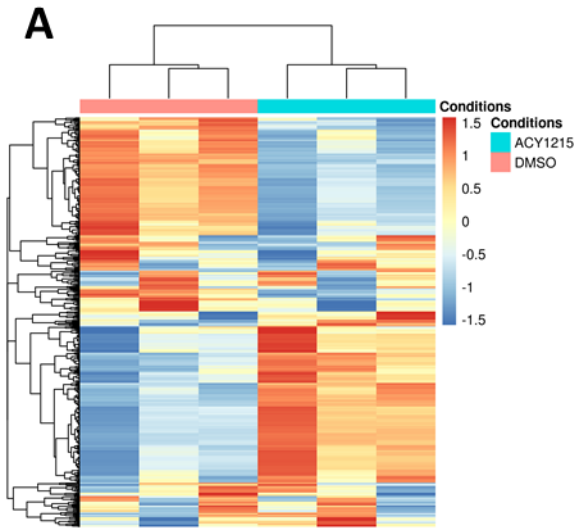


Figure 32. Modulation transcriptomique globale induite par l'inhibition d'HDAC6 dans les cellules primaires

A : Carte thermique (Heatmap) des gènes exprimés de manière différentielle (DEG) dans les cellules exposées à l'ACY1215 ou au DMSO (contrôle) ; n=3.

B: Volcano plot des 26897 gènes identifiés (points). Les gènes ont été considérés comme DEG (points rouges) avec un seuil en Log2 fold change de 1 et un seuil de valeur p ajustée de 0,05 avec 1170 régulés positivement et 786 régulés négativement.

C : Analyse en composantes principales. Chaque point représente un échantillon RNA-Seq. Les groupes d'échantillons sont indiqués par l'utilisation de couleurs différentes, comme indiqué dans la légende. Abréviations : PC1, principal component 1; PC2, principal component.

D : Analyse d'enrichissement des ensembles de gènes (GSEA) des DEG montrant un enrichissement pour les érythroblastes de la moelle osseuse (score d'enrichissement normalisé (NES) = -7,322 ; taux de fausse découverte (FDR) < 0,001 ; p<0,001), le métabolisme de l'hème (NES = -6,173 ; FDR<0,001 ; p<0,001), les cibles GATA1 (NES = -3,238 ; FDR<0,001, p<0,001), les cibles E2F (NES = -3,819 ; FDR <0,001 ; p<0,001), le cycle cellulaire (NES = -2,266 ; FDR<0,01 ; p<0,001).

IV. Le knockdown d'HDAC6 dans la lignée cellulaire érythroleucémique UT7/EPO a réprimé la différenciation érythroïde au niveau transcriptionnel

Afin d'éviter tout effet hors cible de l'inhibiteur chimique d'HDAC6 et pour disposer d'un grand nombre de cellules facilement disponibles pour les études biochimiques, nous avons mis en place un modèle de knockdown d'HDAC6 basé sur le shRNA dans la lignée cellulaire érythroleucémique UT7/EPO, une lignée cellulaire qui prolifère en présence d'EPO et exprime un niveau basal élevé d'HDAC6^{616,617}.

Cette stratégie shRNA a induit une diminution de 50 % d'HDAC6 au niveau de l'ARN et de la protéine (Figure 33A et B). Le knockdown d'HDAC6 a conduit à une hyper acétylation de l' α -tubuline de manière similaire à ce qui a été observé après une inhibition chimique médiée par l'ACY-1215 dans les cellules primaires (Figure 33C). Le knockdown médié par le shRNA HDAC6 n'a pas induit d'apoptose dans les cellules UT7/EPO, comme le montre la coloration de l'Annexine V (Figure 33D), mais a diminué l'expression de la GPA à la surface des cellules, comme l'indique la CMF (Figure 33E) et au niveau de l'ARN (Figure 33F), de manière cohérente avec ce qui a été observé dans les cellules primaires après l'ACY-1215.

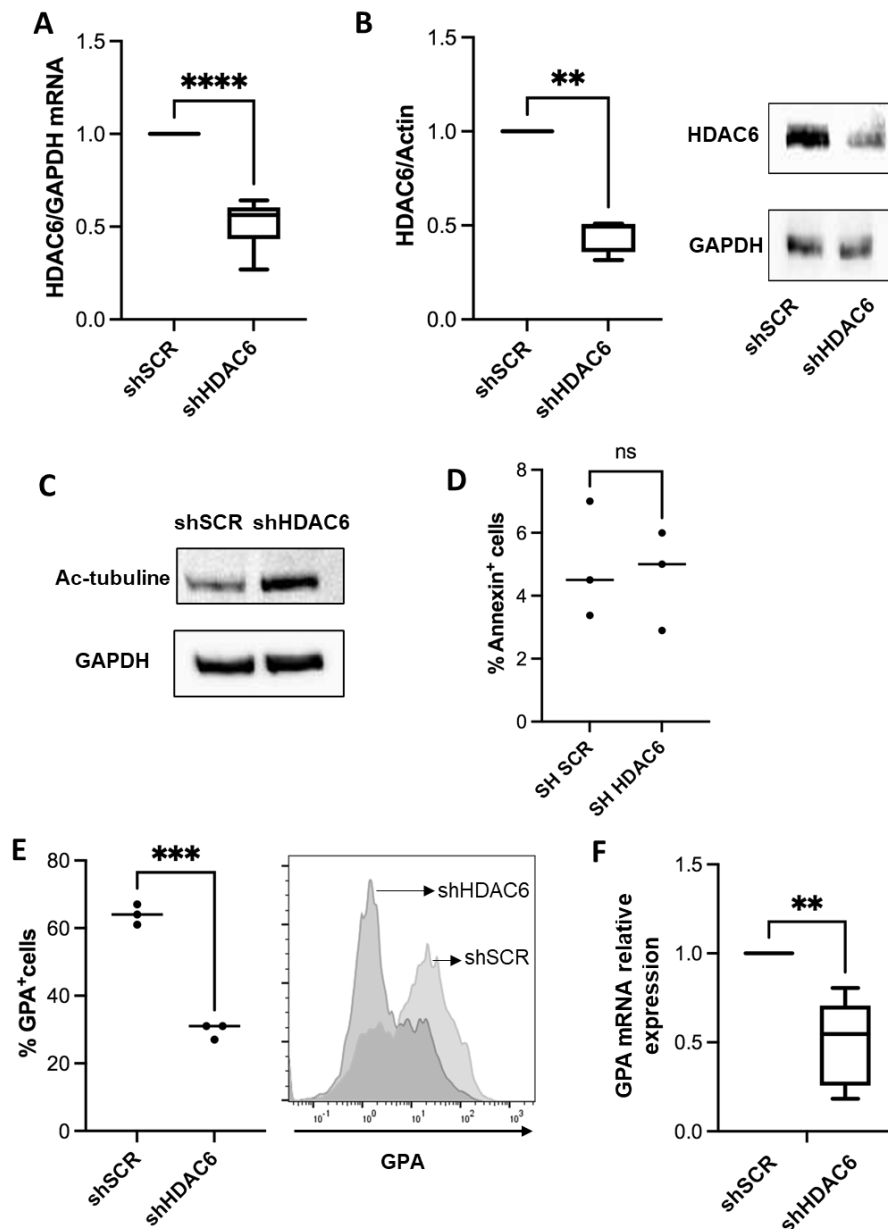


Figure 33. Conséquences du knockdown d'HDAC6 médié par un shRNA dans la lignée cellulaire érythroleucémique UT7/EPO.

A : Efficacité du knockdown d'HDAC6 au niveau de l'ARN évaluée par RQ-PCR dans les cellules UT7/EPO transduites avec un lentivirus codant pour un shRNA spécifique. Pourcentage moyen de diminution par rapport à shSCR : 52 % (± 12) ; $n=8$; $p<0,0001$.

B : Gauche : Efficacité du knockdown d'HDAC6 au niveau protéique évaluée par Western blot dans les cellules UT7/EPO. Pourcentage moyen de diminution par rapport à shSCR : 45 % (± 9) ; $n=4$; $p<0,01$.

C : Hyperacétylation de l' α -tubuline dans les cellules UT7/EPO transduites avec le vecteur lentiviral shHDAC6. Une expérience représentative est présentée ($n=3$).

D : Coloration de l'Annexine V dans les cellules UT7/EPO transduites avec shSCR et shHDAC6. % de cellules Annexine V⁺ : 4,9 % ($\pm 1,9$) vs 4,6 % ($\pm 1,6$), $n=3$, ns.

E : Diminution de l'expression de GPA à la surface des cellules UT7/EPO exprimant un shRNA HDAC6 : pourcentage de cellules GPA⁺ shSCR vs. shHDAC6 : 64% (± 3) vs. 29,7% ($\pm 2,3$), $n=3$; $p<0,001$. L'histogramme d'une expérience représentative est montré à droite.

F : Diminution de l'expression en ARN de la GPA dans les cellules UT7/EPO exprimant un shRNA HDAC6, évaluée par RQ-PCR : pourcentage d'expression relative de shHDAC6 par rapport à shSCR : 51 % (± 23) ; n=6 ; p<0,01.

V. Le knockdown d'HDAC6 dans les cellules UT7/EPO et son inhibition dans les cellules primaires érythroïdes ont inhibé la phosphorylation de JAK2 en réponse à l'EPO.

Nous avons utilisé le modèle cellulaire UT7/EPO pour étudier la réponse de JAK2/STAT5 à la stimulation de l'EPO après knockdown d'HDAC6 ou inhibition chimique. L'inhibition d'HDAC6 a diminué la phosphorylation de JAK2 en réponse à l'EPO (Figure 34A et B) ainsi que l'activation de STAT5 (Figure 34C et D), comme le montrent nos résultats d'immunoblot. En revanche, la voie ERK n'a pas été significativement affectée dans cette lignée cellulaire (Figure 34E et F).

Nous avons ensuite évalué la réponse de JAK2 à l'EPO dans des cellules primaires humaines, par cytométrie en flux. Nous avons d'abord validé cette méthode dans des cellules UT7/EPO et confirmé la diminution de l'activation de JAK2 en réponse à l'EPO, ce qui est cohérent avec la baisse observée en immunoblot (Figure 34G). Dans les cellules primaires, nous avons observé une diminution de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) de p-JAK2 après stimulation par l'EPO, lorsque les cellules ont été exposées à l'ACY-1215 en comparaison avec le DMSO, confirmant une signalisation JAK2 défectueuse en aval de la stimulation par l'EPOR dans les deux modèles cellulaires (Figure 34H).

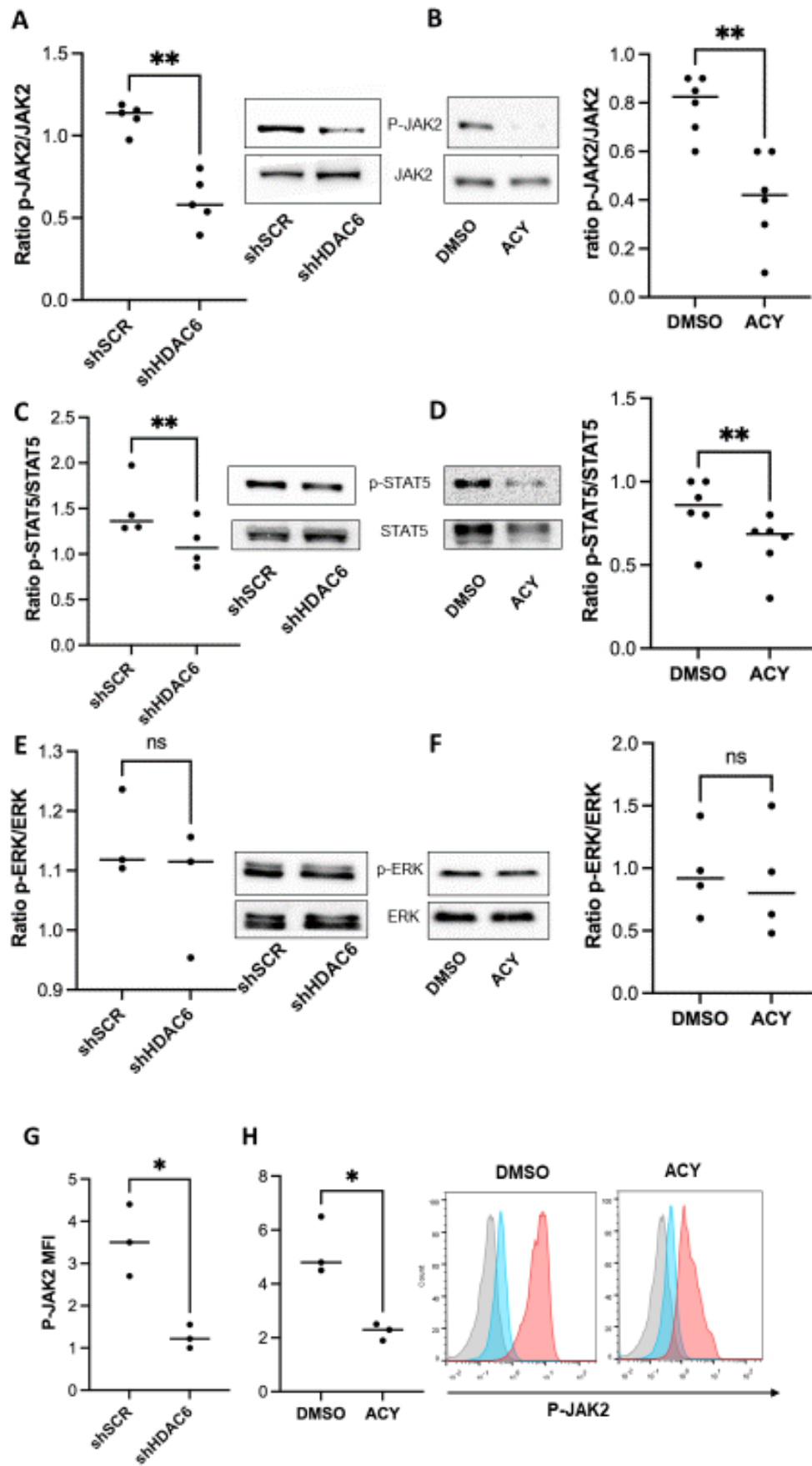


Figure 34. Le knockdown et l'inhibition chimique d'HDAC6 dans les cellules UT7/EPO et les cellules primaires entraînent une diminution de la phosphorylation de JAK2 et de STAT5 en réponse à l'EPO.

A : À gauche : Rapport P-JAK2/JAK2 dans les cellules UT7/EPO évalué par immunoblot après stimulation par l'EPO entre les cellules shSCR et shHDAC6-transduites : Rapport moyen P-JAK2/JAK2 : shSCR vs. shHDAC6 : 1,11 ($\pm 0,08$) vs. 0,60 ($\pm 0,16$) ; n=5 ; p<0,01. À droite : une expérience représentative est présentée.

B : À droite : ratio P-JAK2/JAK2 dans les cellules UT7/EPO évalué par immunoblot après stimulation par l'EPO dans les cellules UT7/EPO exposées au DMSO ou à 0,5 μ M d'ACY-1215 : Rapport moyen P-JAK2/JAK2 : DMSO vs. ACY : 0,79 ($\pm 0,12$) vs. 0,41 ($\pm 0,19$) ; n=6 ; p<0,01. À gauche : une expérience représentative est présentée.

C : À gauche : Rapport P-STAT5/STAT5 dans les cellules UT7/EPO évalué par immunoblot après stimulation par l'EPO dans les cellules shSCR et shHDAC6-transduites ; Rapport moyen P-STAT5/STAT5 shSCR vs. shHDAC6 : 1,5 ($\pm 0,32$) vs. 1,11 ($\pm 0,26$) ; n=4 ; p<0,01. À droite : une expérience représentative est présentée.

D : À droite : Rapport P-STAT5/STAT5 évalué par immunoblot après stimulation par l'EPO dans les cellules UT7/EPO exposées au DMSO ou à 0,5 μ M d'ACY-1215 : Rapport moyen P-STAT5/STAT5 DMSO vs. ACY : 0,84 ($\pm 0,19$) vs. 0,62 ($\pm 0,17$) ; n= 6 ; p<0,01. À gauche : une expérience représentative est présentée.

E : À gauche : Rapport P-ERK/ERK dans les cellules UT7/EPO évalué par immunoblot après stimulation par l'EPO dans les cellules shSCR et shHDAC6-transduites ; Rapport moyen P-ERK/ERK shSCR vs. shHDAC6 : 1,15 ($\pm 0,07$) vs. 1,07 ($\pm 0,11$) ; n=3 ; ns. À droite : une expérience représentative est présentée.

F : À droite : Rapport P-ERK/ERK évalué par immunoblot après stimulation par l'EPO dans les cellules UT7/EPO exposées au DMSO ou à 0,5 μ M d'ACY-1215 : Rapport moyen P-ERK/ERK DMSO vs. ACY : 0,96 ($\pm 0,34$) vs. 0,89 ($\pm 0,45$) ; n= 4 ; ns. À gauche : une expérience représentative est présentée.

G : Rapport P-JAK2/JAK2 après stimulation par l'EPO dans les cellules UT7/EPO shSCR et shHDAC6-transduites, évalué par phosphoflow : MFI P-JAK2 moyen shSCR vs. shHDAC6 : 3,5 \pm 0,9 vs. 1,3 \pm 0,3 ; n=3 ; p<0,01.

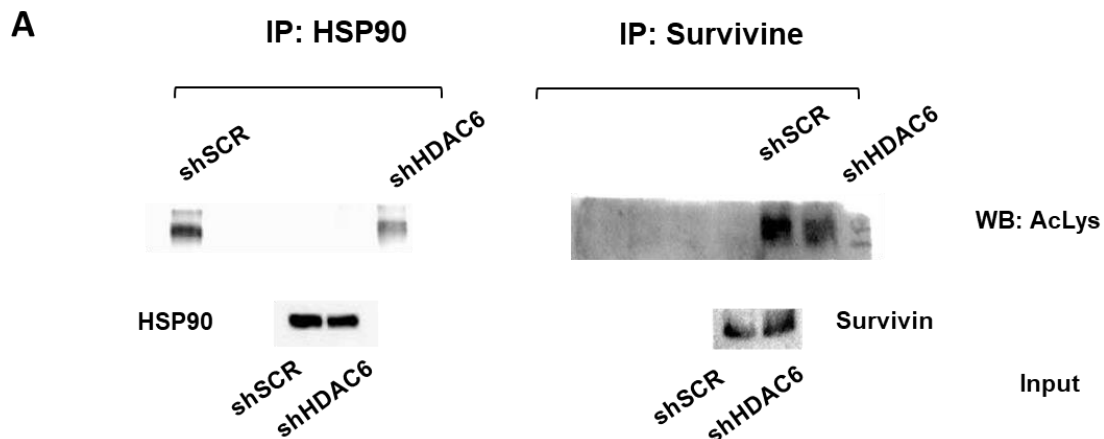
H : À gauche : Rapport P-JAK2/JAK2 après stimulation de l'EPO dans les érythroblastes primaires humains exposés au DMSO ou à 0,5 μ M d'ACY-1215 évalué par phosphoflow : Moyenne P-JAK2 MFI DMSO vs. ACY : 5,2 \pm 1,1 vs. 2,2 \pm 0,3 ; n=3 ; p<0,01, n=3. À droite : histogrammes d'une expérience représentative : gris : isotype, bleu : après privation d'EPO, rose : après restimulation par l'EPO.

VI. Profil acétylomique des érythroblastes humains après inhibition d'HDAC6

Afin d'identifier les cibles d'HDAC6 dans l'érythropoïèse humaine, nous avons d'abord développé une approche « candidate » en sélectionnant les cibles potentielles en fonction des données publiées et de nos propres résultats. Nous avons sélectionné initialement deux candidats : Survivine et HSP90. La Survivine est une protéine qui a été impliquée récemment dans l'érythropoïèse murine⁶²⁰ et signalée comme étant une cible d'HDAC6. L'exposition à un HDAC6i a conduit à sa translocation nucléaire et à sa dégradation accélérée⁶²¹. HSP90 est également une cible connue d'HDAC6. Son rôle dans l'érythropoïèse a été récemment décrit dans la stabilisation des Hb- β et Hb- γ immatures dépourvus d'hème⁶²². Le niveau d'acétylation

de ces deux candidats a été évalué par IP dans les cellules UT7/EPO après knockdown d'HDAC6. Aucun d'entre eux n'était hyperacétylé, ce qui suggère que HSP90 et la Survivine ne sont pas impliqués dans le retard érythroïde observé dans les cellules humaines (Figure 35A). Il est à noter que le knockdown d'HDAC6 dans les cellules UT7/EPO ne modifie pas substantiellement la localisation de la Survivine, celle-ci restant située principalement dans le noyau (Figure 35C).

Une autre approche fondée sur l'étude de l'acétylome global a ensuite été mise en œuvre afin d'identifier directement les cibles d'HDAC6 dans les cellules primaires à J10 de la différenciation après une exposition à 0,5 μ M d'ACY-1215 ou de DMSO comme témoin. Brièvement, des extraits de protéines ont été immunoprécipités à l'aide d'un anticorps anti-acétyl-lysine, puis les protéines acétylées ont été analysées par spectrométrie de masse. Nous avons identifié 30 protéines significativement plus acétylées dans la condition ACY-1215. Il est à noter que nous avons trouvé (i) une hyperacétylation significative de la tubuline α , une cible spécifique d'HDAC6 connue dans de nombreux types de cellules, et (ii) aucune hyperacétylation de l'histone H3, validant notre approche puisqu'elles représentent respectivement un contrôle interne positif et négatif (Figure 35B). Parmi ces protéines disponibles, nous avons fait une première sélection de 24 candidates qui ont la plus forte expression pendant l'érythropoïèse (à partir de la base de données DAMP transcriptomique).



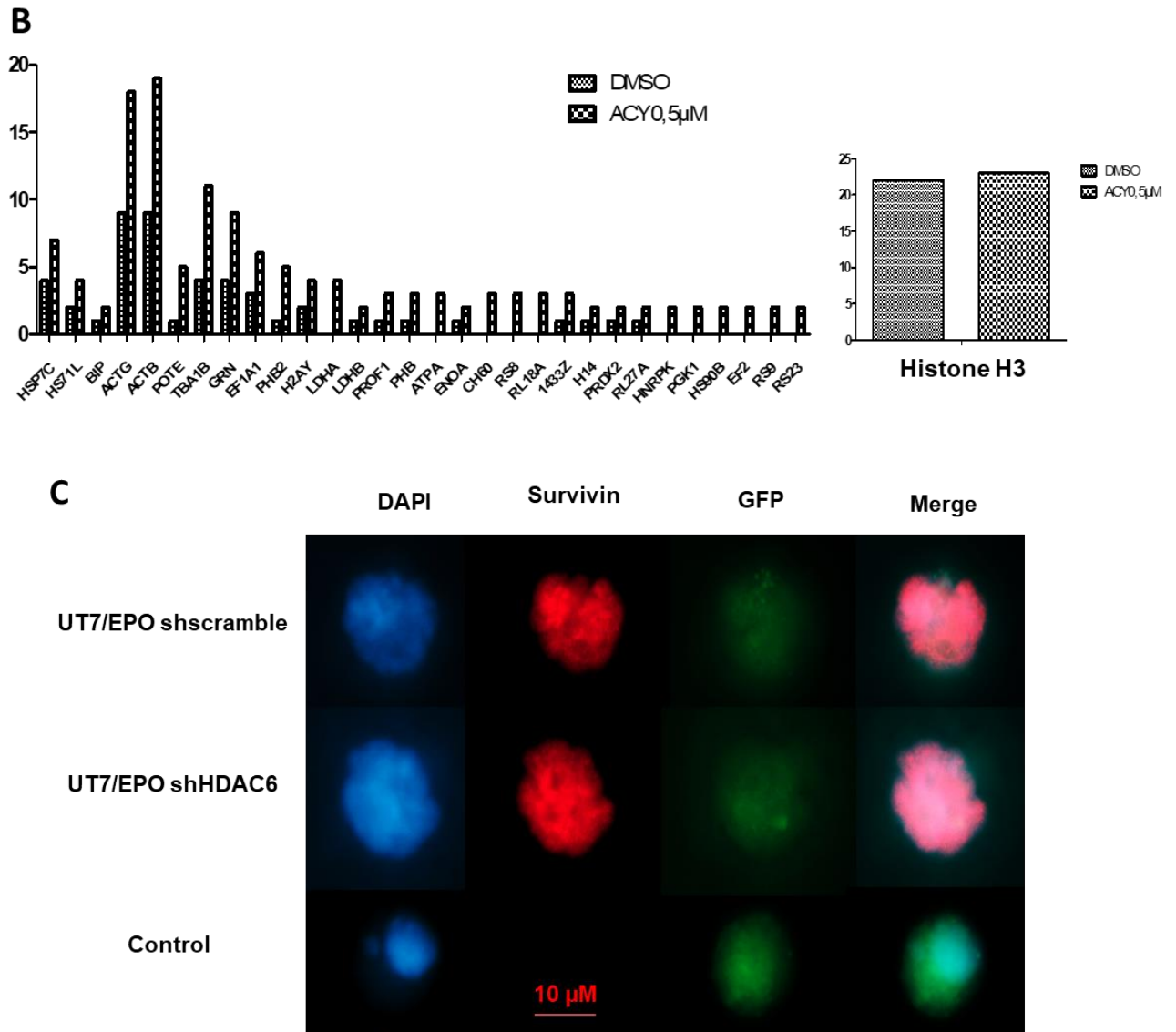


Figure 35. Profil acétylomique des érythroblastes humains après inhibition d'HDAC6.

A : Immunoprécipitation dans les cellules UT7/EPO transduites shHDAC6 des protéines HSP90 et survivine et révélation en Western Blot de leur statut d'acétylation (n=1).
 B : Acétylome global. Protéines hyperacétylées retrouvées dans les cellules primaires traitées avec ACY-1215. Le statut d'acétylation de l'histone H3, cible des HDAC de classe I n'est pas modifié (n=1).
 C : Localisation de la Survivine dans les cellules UT7/EPO par immunofluorescence. La répression d'HDAC6 dans les cellules UT7/EPO par stratégie lentivirale shRNA ne modifie pas la localisation de la Survivine qui reste principalement située dans le noyau (n=2).

VII. La régulation du statut d'acétylation de la 14.3.3ζ par l'activité désacétylase d'HDAC6 contrôle les interactions JAK2/LNK dans les cellules érythroïdes humaines

Dans la liste des protéines potentiellement hyperacétylées sélectionnées à travers l'étude de l'acétylome global, nous avons identifié la protéine 14-3-3ζ comme une cible potentielle

d'HDAC6 impliquée dans le défaut érythroïde observé dans les cellules UT7/EPO et primaires. Nous nous sommes concentrés sur 14-3-3 ζ car (i) la 14-3-3 ζ est une cible connue d'HDAC6 dans les cellules HEK et la lignée de cellules mammaires MDA-MB-231⁶²³, (ii) la 14-3-3 ζ interagit avec LNK, un régulateur négatif de la signalisation de l'EPO médiée par JAK2⁶²⁴. Dans les cellules hématopoïétiques murines, 14-3-3 ζ interfère directement dans l'interaction LNK-JAK2 en séquestrant LNK et en libérant JAK2, ce qui explique les effets positifs de 14-3-3 ζ sur la prolifération cellulaire⁵⁵².

Nous avons d'abord évalué le niveau d'acétylation de 14-3-3 ζ dans les cellules primaires après exposition à l'ACY-1215. Nous avons réalisé une immunoprécipitation de 14-3-3 ζ suivie d'un Western Blot en utilisant (i) un anticorps anti-acétyl lysine et (ii) un anticorps anti-14-3-3 ζ comme contrôle de charge. L'inhibition d'HDAC6 a induit une hyperacétylation de 14-3-3 ζ , confirmant les résultats de l'acétylome (Figure 36A). Nous avons analysé les interactions directes LNK/14-3-3 ζ en utilisant d'abord l'immunoprécipitation de 14-3-3 ζ et la révélation avec un anticorps anti-LNK. Comme le montre la Figure 36B, l'ACY-1215 a diminué l'interaction 14-3-3 ζ /LNK. Nous avons ensuite immunoprécipité LNK et comparé son interaction avec JAK2 et 14-3-3 ζ avant et après exposition à l'ACY-1215. Nous avons observé que l'ACY-1215 diminuait l'interaction LNK/14-3-3 ζ (Figure 36C) et augmentait négativement celle de LNK/JAK2 (Figure 36D). Ensemble, ces données montrent que l'inhibition d'HDAC6 libérait LNK de son interaction avec 14-3-3 ζ , augmentant sa disponibilité pour interagir avec JAK2 et l'inhiber.

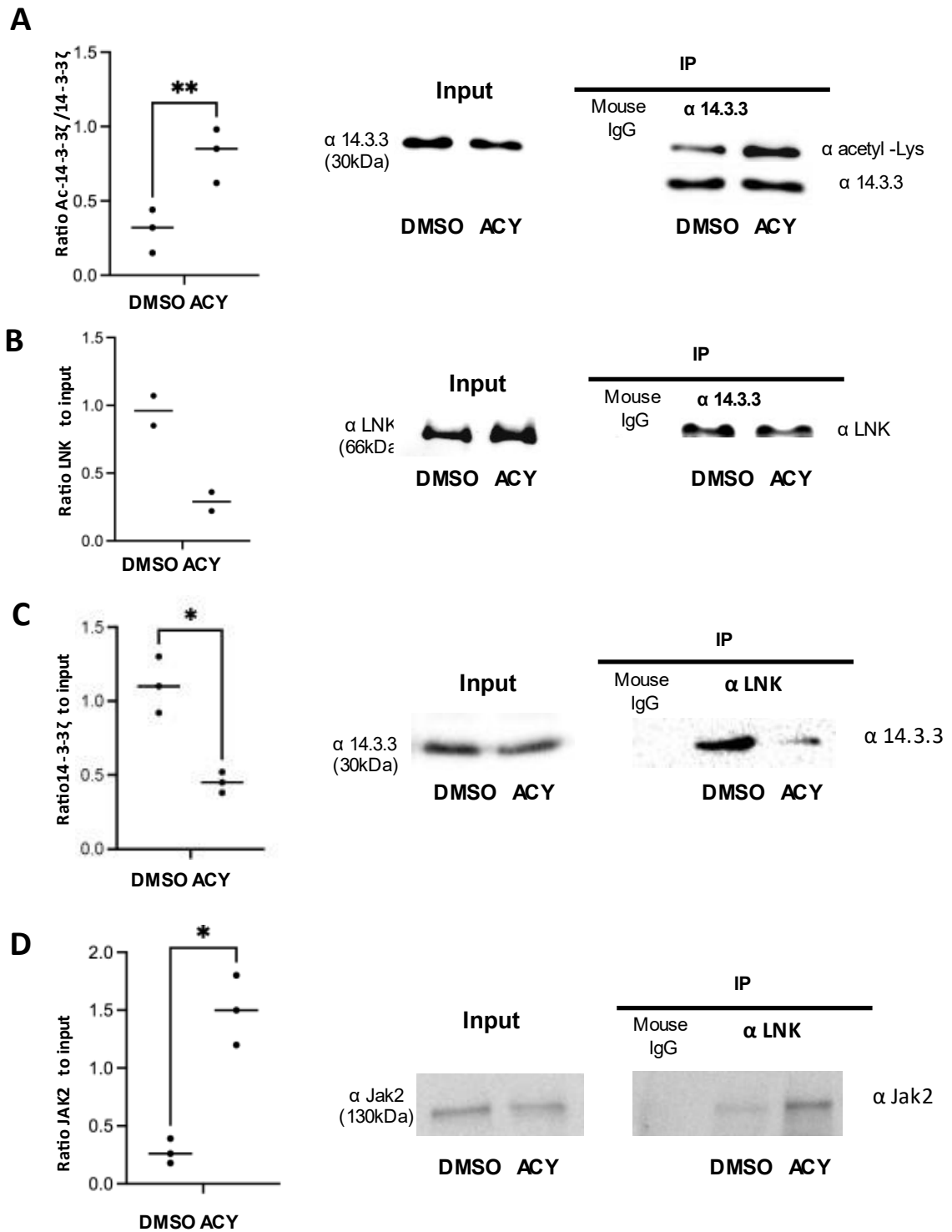


Figure 36. L'inhibition d'HDAC6 dans les cellules primaires entraîne une hyperacétylation de la 14-3-3 ζ , une diminution de la LNK/14-3-3 ζ et une augmentation de l'interaction JAK2/LNK.

A : Niveau d'acétylation de la 14-3-3 ζ évalué après immunoprécipitation de la 14-3-3 ζ et révélation à l'aide d'un anticorps anti acétyl lysine dans des érythroblastes primaires humains après exposition au DMSO ou à 0,5 μ M d'ACY-1215. À gauche : rapport acétyl-14-3-3 ζ / 14-3-3 ζ total ; DMSO vs. ACY : 0,30 (\pm 0,146) vs.0,82(\pm 0,18) ; n= 3 ; p=0,002. À droite : une expérience représentative est présentée.

B : Interaction 14-3-3 ζ /LNK évaluée par immunoprécipitation de 14-3-3 ζ et révélation à l'aide d'un anticorps anti-LNK dans des érythroblastes primaires humains après exposition au DMSO ou à 0,5 μ M d'ACY-1215. À gauche : résumé de 2 expériences indépendantes, DMSO vs. ACY : 0,96 vs. 0,29. À droite : Une expérience représentative est montrée.

C : Interaction 14-3-3 ζ /LNK évaluée par immunoprécipitation de LNK et révélation à l'aide d'un anticorps anti-14-3-3 ζ dans des érythroblastes primaires humains après exposition au DMSO ou à 0,5 μ M d'ACY-1215. À gauche : ratio 14-3-3 ζ après IP/total 14-3-3 ζ : DMSO vs. ACY : 1,11 (\pm 0,19) vs.0,45(\pm 0,07) ; n= 3 ; p<0,05. À droite : une expérience représentative est présentée.

D : Interaction JAK2/LNK évaluée par immunoprécipitation de LNK et révélation à l'aide d'un anticorps anti-JAK2 dans des érythroblastes primaires humains après exposition au DMSO ou à 0,5 μ M d'ACY-1215. À gauche : ratio JAK2 après IP/total JAK2 : DMSO vs. ACY : 0,28 (\pm 0,1) vs.1,5(\pm 0,3) ; n= 3 ; p<0,05. À droite : une expérience représentative est présentée.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'expression et l'activité des HDAC sont modifiées dans de nombreux types de cancers¹⁹⁶. C'est pourquoi ces enzymes sont considérés comme des cibles thérapeutiques potentielles particulières. L'intérêt manifesté pour leur étude s'est traduit par le développement de nombreux inhibiteurs chimiques de leur activité. Cependant, la majorité des inhibiteurs d'HDAC (HDACi) ne sont pas sélectifs. En effet, ils inhibent plusieurs isozymes d'HDAC différents et présentent des effets secondaires toxiques en raison de leur large spectre d'activité. Parmi ces effets secondaires, la toxicité hématologique, notamment l'anémie, est l'une des plus fréquentes^{207-213,226}.

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle des HDAC dans l'érythropoïèse chez la souris et l'homme. Les HDACi FK228 et TSA ont diminué la différenciation érythroïde par l'EPO et induit l'apoptose dans un modèle de différenciation *in vitro* de cellules CD34⁺ humaines, bien que ni le type d'HDAC ciblé ni le mécanisme sous-jacent n'aient été identifiés⁵⁷⁹. HDAC1, une HDAC de classe I, régule le programme transcriptionnel érythroïde en interagissant, au sein de complexes corépresseurs, avec des facteurs de transcription tels que GATA1, Gfi-1B, TAL-1, PU-1, BCL-11a et KLF1, ce qui permet le contrôle de leur disponibilité et de leur activité au cours de la différenciation érythroïde^{580,581,585,625}. HDAC2, une autre HDAC de classe I, joue un rôle dans la condensation nucléaire et l'énucléation des érythroblastes tardifs²⁵⁵. Le KO de HDAC1/2 dans les cellules hématopoïétiques est létal chez la souris, entraînant des défauts hématopoïétiques sévères particulièrement prédominants dans la lignée érythroïde avec une diminution de la maturation et une augmentation de l'apoptose⁶¹³. Les travaux de Yan et al., ont montré dans cellules murines proérythroblastiques déficitaires en GATA1 (G1E), que l'interaction entre GATA1 et HDAC1 est nécessaire à la désacétylation de GATA1, et que ce processus permet de réguler des populations spécifiques de HSPC, en modulant la liaison chromatinienne et l'activité transcriptionnelle de GATA1 qui contrôlent l'engagement et la différenciation érythroïde/mégacaryocytaire⁶²⁶. Les bases mécanistiques de la régulation de GATA1 par acétylation restent pourtant controversées. En effet, d'autres études rapportent au contraire que c'est l'acétylation de GATA1 qui est associée à une régulation positive de l'érythropoïèse. Il a été démontré dans des cellules MEL que le cofacteur transcriptionnel CPB (*CREB-binding protein*), une acétyltransférase, en se liant au domaine en doigt de zinc de GATA1, stimule fortement l'activité transcriptionnelle de GATA1, ce qui suggère que CBP est nécessaire à la

différenciation érythroïde⁶²⁷. De plus, dans des cellules G1E, CBP acétyle GATA1 au niveau de deux motifs riches en lysine hautement conservés, présents aux extrémités C-terminales des deux doigts de zinc. Des mutations de l'un ou l'autre motif ont réduit la fonction de GATA1 sans affecter sa capacité à lier l'ADN⁵⁹³. Par ailleurs, la protéine de la famille BET, BRD3, se lie via son premier bromodomaine (BD1) à GATA1 d'une manière dépendante de l'acétylation *in vitro* et *in vivo*. La mutation d'un seul résidu dans BD1 (Y72F) qui est impliqué dans la liaison acétyl-lysine abroge le recrutement de BRD3 par GATA1, ce qui démontre que l'acétylation de GATA1 est essentielle à l'association de BRD3 avec la chromatine. L'inhibition pharmacologique de l'interaction de GATA1 avec BRD3 réduit l'association des deux protéines au niveau de gènes érythroïdes clés et altère la maturation érythroïde médiée par GATA1, ce qui reproduit les défauts érythroïdes également observés avec les mutants du site d'acétylation de GATA1⁶²⁸.

Parmi les HDAC de classe II, HDAC5 interagit directement avec GATA1, réprimant son activité transcriptionnelle et la différenciation des cellules MEL⁵⁹¹. L'EPO libère GATA1 de ce complexe, ce qui entraîne son acétylation, tandis que les progéniteurs HDAC5^{-/-} présentent une différenciation érythroïde accrue⁵⁹².

HDAC5 fait partie du complexe NuRSERY contenant pERK et les facteurs de transcription GATA1 et KLF1, favorisant leur importation nucléaire⁵⁹⁴. Plus récemment, Wang et al. ont montré que l'expression d'HDAC5 augmente de façon importante au cours des derniers stades de l'érythropoïèse humaine et que la désacétylation de protéines histones et non-histones par HDAC5 serait en fait nécessaire à la survie, à la prolifération et à l'énucléation dans les érythroblastes humains tardifs. La déficience en HDAC5 ou son inhibition pharmacologique a notamment entraîné une augmentation de l'acétylation de H4 (K12) qui s'est accompagné d'une diminution de la condensation chromatinienne, ce qui implique que la désacétylation de H4 (K12) médiée par HDAC5 jouerait un rôle dans la condensation chromatinienne⁵⁹⁵.

Dans un modèle murin, HDAC6 de la classe IIb des HDAC, a été impliquée dans le processus d'énucléation de la différenciation érythroïde terminale. En effet, au sein des érythroblastes fœtaux de souris, mDia2 protéine effectrice de la famille des formines joue un rôle important dans l'énucléation en favorisant la formation de l'anneau contractile d'actomyosine (CAR). mDia2 est régulé par acétylation et désacétylation au niveau de la lysine 970 situé dans le domaine d'homologie 2 de la formine. Sa désacétylation par HDAC6 dans les érythroblastes de souris conduit à son activation, et subséquentement à la formation du CAR au niveau du sillon

de clivage puis à l'énucléation²⁸⁹. L'inhibition d'HDAC6 pourrait provoquer l'accumulation de mDia2 acétylée, ce qui a pour effet de perturber la formation du CAR et les processus ultérieurs de cytokinèse et d'énucléation. La surexpression de mDia2 non désacétylée corrige le défaut d'énucléation lié à l'invalidation d'HDAC6²⁸⁹. Toutefois, il est à noter que des érythroblastes déficients en mDia2 peuvent conserver leur capacité d'énucléation, ce qui suggère que d'autres mécanismes sont impliqués dans ce processus²⁹⁰.

Dans notre travail, nous montrons que l'inhibition pharmacologique d'HDAC6 bloque la différenciation érythroïde humaine *in vitro*. Dans les cellules primaires traitées avec ACY-1215, le retard de maturation observé se produit à une étape antérieure de l'érythropoïèse, et plus précisément au jour 8 de notre protocole de culture qui marque le passage entre les cellules GPA^{low} et GPA^{high}, ce qui correspond à la transition des stades CFU-E/Pro-E aux stades des précurseurs tardifs. En effet, sous inhibition pharmacologique d'HDAC6, nous montrons une baisse de l'expression de la GPA et du CD71, deux marqueurs exprimés au cours de la maturation érythroïde^{338,341}. De plus, la coloration MGG a révélé une accumulation d'érythroblastes immatures au détriment des érythroblastes matures. Au niveau transcriptomique, nous observons un profil immature dans l'expression des gènes érythroïdes caractérisée par une augmentation de l'expression de GATA2, impliqué dans la phase proliférative précoce et une diminution de l'expression des gènes associés à la différenciation érythroïde tardive comme la globine α , EPOR et GATA1^{373,629}. Au niveau protéique, cette immaturité s'illustre par la baisse de la quantité de GATA1 et d'hémoglobine.

Nous avons ensuite évalué la localisation cellulaire d'HDAC6 dans les cellules érythroïdes. Plusieurs études montrent qu'HDAC6 reste majoritairement localisée dans le compartiment cytoplasmique grâce à l'action des motifs NES et SE14, et y exerce ses fonctions biologiques principales^{51,56}. Cependant, HDAC6 porte aussi une séquence de localisation nucléaire (NLS), capable d'interagir avec l'importine α et permettant ainsi sa translocation vers le noyau³¹, où elle pourrait impacter le niveau d'acétylation des histones et contrôler l'expression des gènes¹⁰⁸. Dans les cellules érythroïdes primaires, nous montrons qu'HDAC6 est principalement localisée dans le compartiment cytoplasmique et que son inhibition n'a pas modifié significativement le niveau d'acétylation de l'histone H3.

La question du statut des histones en tant que cibles physiologiques d'HDAC6 reste discutée¹²⁸. En effet, bien que des essais de réaction enzymatique suggèrent que HDAC6 pourrait désacétyler les histones *in vitro*¹³, il n'y a actuellement aucune preuve formelle de cette même

activité HDAC *in vivo*. Par conséquent, le rôle d'HDAC6 dans la différenciation érythroïde humaine semble principalement lié aux modifications post-traductionnelles par désacétylation des substrats cytoplasmiques.

Chez l'homme, HDAC6, membre de la classe IIb des HDAC, semble être une cible clé dans le traitement des hémopathies malignes. En effet, l'inhibition d'HDAC6 induit l'hyperacétylation de l'une de ses cibles bien identifiées, la chaperonne HSP90, qui joue un rôle important dans le maintien de la fonctionnalité des régulateurs clés de l'hématopoïèse maligne tels que la protéine mutante FLT3 ou la protéine de fusion BCR-ABL, ainsi que dans la régulation des protéines de signalisation telles qu'AKT, c-Raf et JAK2⁶³⁰.

La capacité des HDACi à réguler les voies de signalisation dépendantes de JAK2 a été largement explorée dans le cadre des néoplasies myéloprolifératives porteuses de la mutation V617F constitutivement active. Cette mutation provoque l'activation spontanée de JAK2 qui induit constitutivement l'activité transcriptionnelle de STAT5 en l'absence d'EPO, et qui favorise ainsi l'hypersensibilité aux cytokines ainsi que l'érythrocytose⁵⁵⁴. La découverte des mutations à gain de fonction comme V617F dans le domaine pseudokinase de JAK2 a constitué une forte justification pour l'utilisation d'inhibiteurs de JAK (Jakinibs). Le ruxolitinib, un puissant inhibiteur de JAK1/2, a été le premier Jakinib approuvé par la FDA pour le traitement des maladies myéloprolifératives. Bien qu'il ait été démontré que les inhibiteurs de JAK2 apportent un bénéfice clinique substantiel dans la myélofibrose (MF), certains patients présentent une maladie réfractaire au traitement ou n'y répondent plus au cours du temps⁶³¹. Dans les études COMFORT-I et COMFORT-II, les taux d'arrêt du ruxolitinib, un Jakinib, étaient d'environ 50 % à 3 ans^{631,632}. Un essai clinique de phase 1/2 rapporte que les patients atteints de MF traités par le ruxolitinib qui présentaient 3 mutations ou plus, quel que soit le type, au début du traitement, étaient moins susceptibles de répondre au ruxolitinib⁶³³. De plus, les patients qui ne répondent pas au traitement par ruxolitinib présentent un pronostic défavorable avec une survie médiane d'environ 14 mois⁶³⁴. D'autres traitements sont ainsi à l'étude afin de modifier de manière significative l'évolution de la maladie et de prolonger la survie des patients atteints de MF. C'est dans ce contexte que les HDACi ont montré leur intérêt thérapeutique. Par exemple, il a été montré qu'ITF2357, un pan-inhibiteur des HDAC, est capable de réguler négativement la quantité protéique de JAK2^{V617F} ainsi que ses voies de signalisation en aval, à la fois dans les lignées cellulaires leucémiques et dans les cellules primaires des patients. En revanche, aucun effet n'a été observé sur l'expression en ARNm de JAK2 aux mêmes doses⁶³⁵. La dégradation de JAK2^{V617F} pourrait être associée à l'action des

protéases de la voie HSP90-protéasome. En effet, ITF2357 serait capable d'inhiber HDAC6^{636,637}, l'enzyme qui régule l'acétylation de HSP90^{638,639} et il a été démontré que JAK2 est un substrat de HSP90⁶⁴⁰. Une autre possibilité est que l'ITF2357 puisse induire une hyperacétylation de JAK2 elle-même ou d'une autre protéine impliquée dans sa stabilisation, telle que SOCS1^{641,642}. Compte tenu du rôle crucial joué par JAK2 au cours de l'érythropoïèse, nous avons émis l'hypothèse que l'anémie observée chez les patients traités par HDAC6i *in vivo*, et le défaut de différenciation érythroïde observé *in vitro* sont liés à une altération de l'axe HSP90/JAK2. Cependant, dans la lignée cellulaire leucémique UT7 et dans des cellules érythroïdes primaires humaines, exprimant toutes deux JAK2 WT, nous avons remarqué que le niveau total de JAK2 est resté inchangé, alors que sa phosphorylation en réponse à l'EPO était diminuée. De plus, le niveau d'acétylation de HSP90 n'a pas été modifié par l'exposition à l'ACY-1215 dans les cellules UT7/EPO. Ceci peut être d'abord dû à une réponse différente de JAK2^{WT} et JAK2^{V617F} aux HDACi. En effet, la protéine JAK2^{V617F} pourrait être plus sensible à la dégradation par les protéases de la voie HSP90-protéasome que la protéine JAK2 de type sauvage⁶⁴³. Bien qu'il ait été considéré que le niveau d'acétylation d'HSP90 médié par HDAC6 était responsable de la stabilité et de l'activité de JAK2, une étude récente montre que, dans les cellules leucémiques portant la mutation JAK2^{V617F} et dans les néoplasies myéloprolifératives induites chez la souris par la mutation MPL^{W515L}, c'est HDAC11, plutôt qu'HDAC6, qui est nécessaire à la prolifération et à la survie via le contrôle de la voie JAK-STAT⁶⁴⁴. Nos résultats n'ont par ailleurs pas démontré de lien évident entre le processus d'hyperacétylation d'HSP90 associé à une dégradation de JAK2 avec une diminution de la réponse de JAK2 à l'EPO qui accompagne le retard de différenciation érythroïde observé après l'inhibition d'HDAC6. C'est pourquoi nous avons postulé qu'HDAC6 régule la signalisation de JAK2 et la différenciation érythroïde par des voies alternatives.

Chez la souris, la délétion homozygote de la survivine entraîne une perte spectaculaire de progéniteurs hématopoïétiques et une mort rapide, tandis que la délétion hétérozygote entraîne un défaut sélectif dans le développement des GR chez environ 20 % des animaux⁶²⁰.

Selon Keerthivasan, la survivine participe à l'énucléation des érythroblastes, via son interaction avec EPS15 et la clathrine, deux protéines cytoplasmiques qui médient le trafic de vésicules endocytiques. Dans les cellules MEL, sa surexpression est suffisante pour induire l'énucléation et dans les érythroblastes primaires elle influence la formation de grandes vacuoles cytoplasmiques, qui à leur tour favorisent la séparation du réticulocyte naissant du noyau^{645,646}. Dans des cellules HeLa, l'équilibre dynamique entre l'acétylation et la désacétylation de la

survivine au niveau d'un seul résidu lysine (K129) détermine sa localisation subcellulaire. Ainsi, l'acétylation dépendante de la CBP au niveau du résidu K129 maintient la localisation nucléaire de la survivine en favorisant son homodimérisation et sa stabilité dans ce compartiment. En revanche, la mutation de ce résidu en un acide aminé non acétylable (E129) inhibe l'homodimérisation de la survivine, ce qui favorise sa liaison à la protéine d'exportation nucléaire CRM1 et entraîne son exportation vers le compartiment cytoplasmique⁶²¹.

Riolo et al. ont identifié HDAC6 comme une désacétylase de la survivine qui antagonise l'acétylation de la survivine dépendante de la CBP. HDAC6 se localise principalement à la jonction nucléaire-cytoplasmique dans les cellules tumorales mammaires quiescentes en culture et dans les tissus tumoraux de patientes atteintes de cancer du sein. Une fois activée par la CBP de manière œstrogène-dépendante, HDAC6 pénètre dans le noyau, ce qui favorise la désacétylation de la survivine et son exportation nucléaire¹⁴².

Nous avons postulé que le statut d'acétylation de la survivine au sein des érythroblastes dépend de l'activité d'HDAC6 et qu'il pourrait avoir un impact dans l'érythropoïèse via une modification de sa fonction ou bien de sa localisation cellulaire. Cependant, nos données ne montrent pas une hyperacétylation de la survivine dans les UT7/EPO shHDAC6, et la localisation de la survivine n'est pas modifiée lorsqu'HDAC6 est inhibée. Nos résultats suggèrent donc qu'HDAC6 ne régule pas le statut d'acétylation de la survivine dans l'érythropoïèse et que l'acétylation de la survivine n'est pas impliquée au cours de ce processus.

L'approche globale par l'étude de l'acétylome a montré que la 14-3-3ζ était potentiellement hyper acétylée dans les cellules érythroïdes humaines primaires après exposition à l'ACY, ce qui suggère que 14-3-3ζ est une cible désacétylable par HDAC6 impliquée dans l'érythropoïèse humaine.

La capacité d'HDAC6 à désacétyler les lysines dans la poche de liaison de la 14-3-3ζ a déjà été décrite dans les lignées cellulaires mammaires HEK et MDA-MB-231¹⁴⁸.

Les protéines 14-3-3 sont une famille de protéines ubiquitaires dépourvues de toute propriété enzymatique intrinsèque mais capables d'interagir avec des partenaires phosphorylés sur des résidus sérine-thréonine et ainsi de moduler leur activité par des mécanismes distincts tels que la modification de leur état conformationnel, de leur activité catalytique, de leur distribution cellulaire ou de leur stabilité⁶⁴⁷⁻⁶⁴⁹.

Elles ont été impliquées, par le biais d'interactions avec des protéines de signalisation, dans le contrôle de la prolifération, du métabolisme ou de la survie des cellules. Les protéines 14-3-3 sont fréquemment surexprimées dans différents types de cancer et leur knockdown sensibilise

les lignées cellulaires malignes à l'apoptose et inhibe la croissance cellulaire^{650,651}.

La 14-3-3 ζ est régulée par des modifications post-traductionnelles, dont l'acétylation. Dans la lignée cellulaire du cancer de la prostate, l'hyper acétylation de la 14-3-3 ζ après HDAC6i conduit à l'activation de ERK et CDC25, au blocage du cycle cellulaire et à l'apoptose⁶⁵².

14-3-3 ζ est un acteur crucial qui intervient dans l'hématopoïèse par différents mécanismes, dépendant du lignage cellulaire. Dans les progéniteurs, elle régule la transduction du signal en aval des récepteurs de cytokines comme le GM-CSF ou l'IL3⁶⁵³.

Au cours de l'érythropoïèse murine de stress, 14-3-3 ζ inhibe la translocation nucléaire de FoxO3 conduisant à une diminution de l'expression des gènes anti-oxydants⁶⁵⁴.

Nous avons émis l'hypothèse que la 14-3-3 ζ était la principale cible des HDAC6i dans les cellules érythroïdes humaines. L'équipe de Jiang a rapporté, dans des cellules souches hématopoïétiques murines, une interaction directe entre LNK et 14-3-3 ζ qui réduit le contrôle négatif exercé par LNK sur la signalisation de JAK2, bien que le mécanisme sous-jacent n'ait pas été décrit⁵⁵².

La régulation négative de l'activité de JAK2 par LNK est cruciale, comme le montre le développement plus rapide de la NMP chez les souris LNK^{-/-} exprimant un JAK2 muté (JAK2^{V617F}), et la description de cas de NMP associés à des mutations de LNK chez l'homme^{561,655}.

Nos résultats montrent que la capacité de LNK à interagir avec JAK2 dans les cellules érythroïdes est régulée par le niveau d'acétylation de la protéine 14-3-3 ζ dépendant d'HDAC6.

En effet, l'exposition à l'ACY-1215 et le knockdown d'HDAC6 dans les cellules UT7/EPO ont conduit à un niveau d'acétylation plus élevé de la 14-3-3 ζ , qui diminue son interaction avec LNK. En revanche, après inhibition d'HDAC6, LNK interagit plus fortement avec JAK2, ce qui conduit à une répression de la signalisation de JAK2 en réponse à l'EPO et à une inhibition de la différenciation érythroïde.

Afin de renforcer l'hypothèse selon laquelle 14-3-3 ζ est une cible désacétylable d'HDAC6 et de vérifier que l'inhibition d'HDAC6 provoque une inhibition des voies de signalisation en aval de JAK2, nous avons réalisé des expériences de phosphoblot dans les UT7/EPO.

Nos résultats de phosphoblot indiquent qu'HDAC6 favorise l'activation de la voie JAK2/STAT5 sans altérer la voie MAPK/ERK, ce qui est en accord avec d'autres données de la littérature. En effet, plusieurs études suggèrent qu'il se produit une transition de l'activité

Ras/MAPK/ERK dominante de c-KIT vers l'activité EPOR/STAT5 au cours de l'érythropoïèse⁴⁵² et que la régulation négative de la signalisation c-KIT est une condition préalable à la différenciation terminale dirigée par EPOR/STAT5. Par exemple, Haas et al montre qu'une mutation activatrice de c-KIT bloque la différenciation érythroïde, via la signalisation médiée par les MAPK et que ce phénotype est partiellement corrigé par l'inhibition des MAPK⁵¹². Il a été en outre démontré que l'expression de K-ras entraîne un blocage partiel de la différenciation érythroïde et une hyperactivation de la signalisation des MAPK⁵¹³. Inversement, l'inactivation de la protéine ERK accélère la différenciation érythroïde des cellules tandis que l'activation de MEK1 y fait obstacle⁵¹⁴. Une analyse plus récente par spectrométrie de masse de la dynamique des phosphoprotéomes combinée à un criblage CRISPR/Cas9 ciblé sur les kinomes a démontré que la régulation négative de l'axe de signalisation c-KIT/MAPK est un facteur clé de la maturation⁴⁵². L'activité de c-KIT et la phosphorylation de ERK2 sont en effet régulées négativement avant la perte d'activité d'EPOR/JAK2 et la maturation érythroïde est accélérée par l'inhibition des composants de signalisation MAPK/ERK. Ce mécanisme permet d'expliquer pourquoi une inhibition pharmacologique d'HDAC6 par ACY-1215 n'affecte pas la prolifération des progéniteurs érythroïdes précoces, mais induit un blocage de la différenciation érythroïde terminale, se traduisant notamment par un retard d'acquisition de la GPA au cours de la transition des stades CFU-E/Pro-E aux stades des précurseurs tardifs.

Ainsi, en plus de son rôle précédemment identifié dans l'énucléation des érythroblastes de foie fœtal de souris par la désacétylation de mDia2, nous décrivons ici un nouveau mécanisme de contrôle de l'érythropoïèse dépendant d'HDAC6 qui intervient par le contrôle du niveau d'acétylation de 14-3-3 ζ , la disponibilité de LNK et enfin l'activation de JAK2 en réponse à l'EPO. Selon notre modèle, l'inhibition d'HDAC6 entraîne une diminution de l'interaction de 14-3-3 ζ avec LNK, qui conduit à une augmentation de la quantité de LNK disponible capable d'interagir avec JAK2, et subséquentement à l'inhibition de JAK2. Ce mécanisme est probablement à l'origine de l'anémie observée au cours du traitement par Ricolinostat (Figure 37).

Afin de renforcer le lien entre l'hyperacétylation de 14-3-3 ζ induite par l'inactivation d'HDAC6, l'inhibition de JAK2 et le défaut de maturation érythroïde, nous menons actuellement des expériences de transduction lentivirale visant à permettre l'expression stable dans des cellules érythroïdes d'une forme non acétylable de la protéine 14-3-3 ζ portant deux mutations sur les résidus lysine qui s'avèrent être des cibles d'HDAC6 (K49R/K120R) (don

généreux du Dr J. Andersen⁶²³). L'expression de la 14-3-3 ζ non acétylée dans les cellules érythroïdes primaires sous inhibition d'HDAC6 devrait permettre de restaurer le phénotype mature avec l'expression de la GPA.

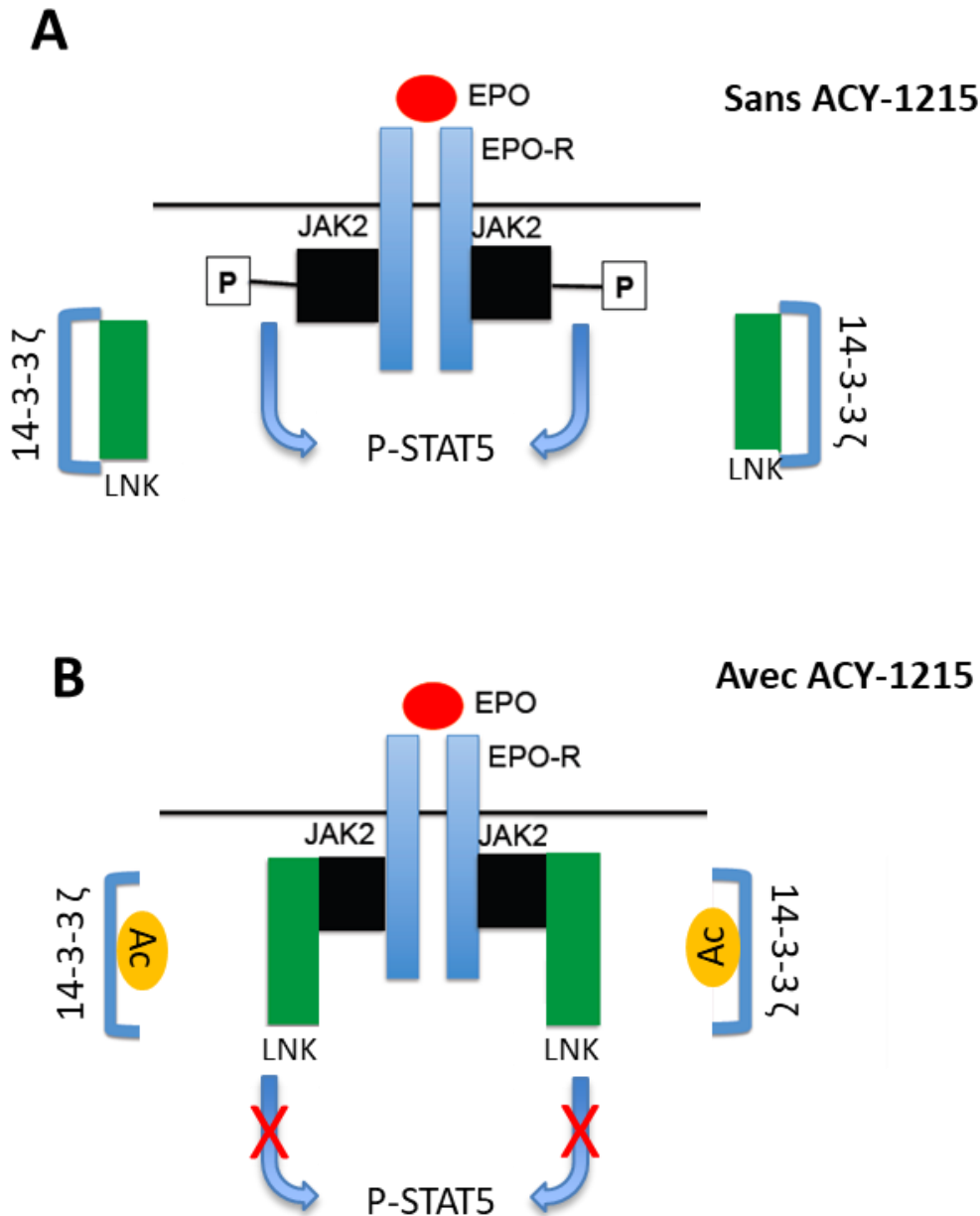


Figure 37. Schéma représentant l'effet de l'ACY-1215 sur la signalisation de JAK2 en aval de l'activation de l'EPOR.

A : Sans ACY-1215, l'interaction 14-3-3 ζ /LNK libère JAK2 de son contrôle négatif exercé par LNK sur son activation et sa signalisation.

B : En présence d'ACY-1215, l'hyperacétylation de la 14-3-3 ζ bloque l'interaction 14-3-3 ζ /LNK, augmentant la fraction de LNK capable d'interagir avec JAK2 et de l'inhiber.

L'inhibition pharmacologique d'HDAC6 pourrait représenter une stratégie thérapeutique intéressante dans le traitement des néoplasies myéloprolifératives (NMP). Dans les NMP, la mutation activatrice JAK2^{V17F} est fréquemment observée : elle représente > 90% des cas des PV, 50 à 60 % des cas de myélofibrose primaire et 50 % des cas de thrombocyémie essentielle⁵⁵⁵⁻⁵⁵⁷. De plus, il a été montré que l'expression de JAK2^{V617F} dans des cellules de moelle osseuse murine déficientes en LNK a rendu les cellules significativement plus sensibles à la transformation par l'oncogène JAK2 par rapport aux cellules de type sauvage dans les tests clonogéniques et a accéléré l'apparition de la PV JAK2^{V617F} chez les souris^{561,563}. LNK pourrait donc être considérée comme un suppresseur de tumeur.

Dans les cellules érythroïdes, nous avons montré que l'inhibition d'HDAC6 favorise l'interaction LNK/JAK2 et ultérieurement le blocage de la prolifération médiée par JAK2/STAT5. Ainsi, les inhibiteurs pharmacologiques d'HDAC6 pourraient potentialiser l'action inhibitrice de LNK sur JAK2 pour réduire la capacité de transformation oncogénique et pourraient s'avérer utile dans le traitement des NMP JAK2^{V617F+} en combinaison avec les Jakinibs.

BIBLIOGRAPHIE

1. Allfrey, V. G., Faulkner, R. & Mirsky, A. E. ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**, 786–794 (1964).
2. Dowling, D. P., Di Costanzo, L., Gennadios, H. A. & Christianson, D. W. Evolution of the arginase fold and functional diversity. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 2039–2055 (2008).
3. Eberharter, A. & Becker, P. B. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO Rep* **3**, 224–229 (2002).
4. Eberharter, A., Ferreira, R. & Becker, P. Dynamic chromatin: concerted nucleosome remodelling and acetylation. *Biol. Chem.* **386**, 745–751 (2005).
5. Kuo, M. H. & Allis, C. D. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* **20**, 615–626 (1998).
6. Marmorstein, R. Structure of histone deacetylases: insights into substrate recognition and catalysis. *Structure* **9**, 1127–1133 (2001).
7. Verdone, L., Caserta, M. & Di Mauro, E. Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochem. Cell Biol.* **83**, 344–353 (2005).
8. Taunton, J., Hassig, C. A. & Schreiber, S. L. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* **272**, 408–411 (1996).
9. Yang, W.-M., Inouye, C., Zeng, Y., Bearss, D. & Seto, E. Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3. *PNAS* **93**, 12845–12850 (1996).
10. Seto, E. & Yoshida, M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, a018713 (2014).
11. Yang, W. M., Yao, Y. L., Sun, J. M., Davie, J. R. & Seto, E. Isolation and characterization of cDNAs corresponding to an additional member of the human histone deacetylase gene family. *J. Biol. Chem.* **272**, 28001–28007 (1997).
12. Emiliani, S., Fischle, W., Van Lint, C., Al-Abed, Y. & Verdin, E. Characterization of a human RPD3 ortholog, HDAC3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2795–2800 (1998).
13. Grozinger, C. M., Hassig, C. A. & Schreiber, S. L. Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4868–4873 (1999).
14. Kao, H. Y., Downes, M., Ordentlich, P. & Evans, R. M. Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression. *Genes Dev.* **14**, 55–66 (2000).
15. Buggy, J. J. *et al.* Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. *Biochem. J.* **350 Pt 1**, 199–205 (2000).

16. Zhou, X., Marks, P. A., Rifkind, R. A. & Richon, V. M. Cloning and characterization of a histone deacetylase, HDAC9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 10572–10577 (2001).
17. Kao, H.-Y., Lee, C.-H., Komarov, A., Han, C. C. & Evans, R. M. Isolation and characterization of mammalian HDAC10, a novel histone deacetylase. *J. Biol. Chem.* **277**, 187–193 (2002).
18. Gao, L., Cueto, M. A., Asselbergs, F. & Atadja, P. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J. Biol. Chem.* **277**, 25748–25755 (2002).
19. Khochbin, S., Verdel, A., Lemercier, C. & Seigneurin-Berny, D. Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 162–166 (2001).
20. Bürger, M. & Chory, J. Structural and chemical biology of deacetylases for carbohydrates, proteins, small molecules and histones. *Commun Biol* **1**, 217 (2018).
21. Rundlett, S. E. *et al.* HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 14503–14508 (1996).
22. Vannini, A. *et al.* Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 15064–15069 (2004).
23. Finnin, M. S. *et al.* Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* **401**, 188–193 (1999).
24. Yang, X.-J. & Seto, E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 206–218 (2008).
25. Sengupta, N. & Seto, E. Regulation of histone deacetylase activities. *Journal of Cellular Biochemistry* **93**, 57–67 (2004).
26. Mano, T., Suzuki, T., Tsuji, S. & Iwata, A. Differential effect of HDAC3 on cytoplasmic and nuclear huntingtin aggregates. *PLoS One* **9**, e111277 (2014).
27. Tong, J. J., Liu, J., Bertos, N. R. & Yang, X.-J. Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1114–1123 (2002).
28. Hsu, K.-C. *et al.* Novel Class IIa-Selective Histone Deacetylase Inhibitors Discovered Using an in Silico Virtual Screening Approach. *Sci Rep* **7**, 3228 (2017).
29. Luo, Z. *et al.* Nuclear-cytoplasmic shuttling of class IIa histone deacetylases regulates somatic cell reprogramming. *Cell Regen (Lond)* **8**, 21–29 (2019).
30. Tao, X., Yan, Y., Lu, L. & Chen, B. HDAC10 expression is associated with DNA mismatch repair gene and is a predictor of good prognosis in colon carcinoma. *Oncology Letters* **14**, 4923–4929 (2017).
31. Liu, Y., Peng, L., Seto, E., Huang, S. & Qiu, Y. Modulation of histone deacetylase 6 (HDAC6) nuclear import and tubulin deacetylase activity through acetylation. *J. Biol. Chem.* **287**, 29168–29174 (2012).

32. Zhang, Y. *et al.* Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 1688–1701 (2008).
33. Blander, G. & Guarente, L. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 417–435 (2004).
34. Greiss, S. & Gartner, A. Sirtuin/Sir2 phylogeny, evolutionary considerations and structural conservation. *Mol. Cells* **28**, 407–415 (2009).
35. Houtkooper, R. H., Cantó, C., Wanders, R. J. & Auwerx, J. The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocr. Rev.* **31**, 194–223 (2010).
36. Cosenza, M. & Pozzi, S. The Therapeutic Strategy of HDAC6 Inhibitors in Lymphoproliferative Disease. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).
37. Bagchi, D. & Nair, S. *Nutritional and Therapeutic Interventions for Diabetes and Metabolic Syndrome*. (Academic Press, 2018).
38. Cheng, F. *et al.* Divergent roles of histone deacetylase 6 (HDAC6) and histone deacetylase 11 (HDAC11) on the transcriptional regulation of IL10 in antigen presenting cells. *Mol. Immunol.* **60**, 44–53 (2014).
39. Zhang, H., Shang, Y.-P., Chen, H.-Y. & Li, J. Histone deacetylases function as novel potential therapeutic targets for cancer. *Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology* **47**, 149–159 (2017).
40. Dokmanovic, M., Clarke, C. & Marks, P. A. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol. Cancer Res.* **5**, 981–989 (2007).
41. Parbin, S. *et al.* Histone deacetylases: a saga of perturbed acetylation homeostasis in cancer. *J. Histochem. Cytochem.* **62**, 11–33 (2014).
42. Mahlknecht, U. *et al.* Assignment of the human histone deacetylase 6 gene (HDAC6) to X chromosome p11.23 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* **93**, 135–136 (2001).
43. Verdel, A. & Khochbin, S. Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. *J. Biol. Chem.* **274**, 2440–2445 (1999).
44. Lin, H.-Y., Chen, C.-S., Lin, S.-P., Weng, J.-R. & Chen, C.-S. Targeting histone deacetylase in cancer therapy. *Med Res Rev* **26**, 397–413 (2006).
45. Smith, B. C. & Denu, J. M. Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. *Biochim Biophys Acta* **1789**, 45–57 (2009).
46. de Ruijter, A. J. M., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S. & van Kuilenburg, A. B. P. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* **370**, 737–749 (2003).
47. Hook, S. S., Orian, A., Cowley, S. M. & Eisenman, R. N. Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 13425–13430 (2002).

48. Olzmann, J. A. *et al.* Parkin-mediated K63-linked polyubiquitination targets misfolded DJ-1 to aggresomes via binding to HDAC6. *J. Cell Biol.* **178**, 1025–1038 (2007).
49. Hard, R. L., Liu, J., Shen, J., Zhou, P. & Pei, D. HDAC6 and Ubp-M BUZ domains recognize specific C-terminal sequences of proteins. *Biochemistry* **49**, 10737–10746 (2010).
50. Kawaguchi, Y. *et al.* The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* **115**, 727–738 (2003).
51. Verdel, A. *et al.* Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr. Biol.* **10**, 747–749 (2000).
52. Bertos, N. R. *et al.* Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention. *J. Biol. Chem.* **279**, 48246–48254 (2004).
53. Palijan, A. *et al.* Function of histone deacetylase 6 as a cofactor of nuclear receptor coregulator LCoR. *J. Biol. Chem.* **284**, 30264–30274 (2009).
54. Toropainen, S., Väisänen, S., Heikkinen, S. & Carlberg, C. The down-regulation of the human MYC gene by the nuclear hormone 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 is associated with cycling of corepressors and histone deacetylases. *J. Mol. Biol.* **400**, 284–294 (2010).
55. Han, Y. *et al.* Acetylation of histone deacetylase 6 by p300 attenuates its deacetylase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **383**, 88–92 (2009).
56. Hubbert, C. *et al.* HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**, 455–458 (2002).
57. Li, Y., Shin, D. & Kwon, S. H. Histone deacetylase 6 plays a role as a distinct regulator of diverse cellular processes. *FEBS J.* **280**, 775–793 (2013).
58. Somoza, J. R. *et al.* Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases. *Structure* **12**, 1325–1334 (2004).
59. Gantt, S. M. L. *et al.* General Base-General Acid Catalysis in Human Histone Deacetylase 8. *Biochemistry* **55**, 820–832 (2016).
60. Gantt, S. L., Joseph, C. G. & Fierke, C. A. Activation and inhibition of histone deacetylase 8 by monovalent cations. *J. Biol. Chem.* **285**, 6036–6043 (2010).
61. Wu, R., Lu, Z., Cao, Z. & Zhang, Y. Zinc chelation with hydroxamate in histone deacetylases modulated by water access to the linker binding channel. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 6110–6113 (2011).
62. Fischle, W. *et al.* Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Mol. Cell* **9**, 45–57 (2002).
63. Zhang, Y., Gilquin, B., Khochbin, S. & Matthias, P. Two catalytic domains are required for protein deacetylation. *J. Biol. Chem.* **281**, 2401–2404 (2006).
64. Zou, H., Wu, Y., Navre, M. & Sang, B.-C. Characterization of the two catalytic domains in histone deacetylase 6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 45–50 (2006).
65. Zhang, M. *et al.* HDAC6 deacetylates and ubiquitinates MSH2 to maintain proper levels of MutSa. *Mol. Cell* **55**, 31–46 (2014).

66. Saito, M. *et al.* Acetylation of intrinsically disordered regions regulates phase separation. *Nat. Chem. Biol.* **15**, 51–61 (2019).
67. Osko, J. D. & Christianson, D. W. Structural Basis of Catalysis and Inhibition of HDAC6 CD1, the Enigmatic Catalytic Domain of Histone Deacetylase 6. *Biochemistry* **58**, 4912–4924 (2019).
68. Porter, N. J. & Christianson, D. W. Structure, mechanism, and inhibition of the zinc-dependent histone deacetylases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **59**, 9–18 (2019).
69. Wang, X.-X., Wan, R.-Z. & Liu, Z.-P. Recent advances in the discovery of potent and selective HDAC6 inhibitors. *Eur J Med Chem* **143**, 1406–1418 (2018).
70. Yang, F., Zhao, N., Ge, D. & Chen, Y. Next-generation of selective histone deacetylase inhibitors. *RSC Adv.* **9**, 19571–19583 (2019).
71. Hai, Y. & Christianson, D. W. Histone deacetylase 6 structure and molecular basis of catalysis and inhibition. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 741–747 (2016).
72. Liu, Y., Li, L. & Min, J. Structural biology: HDAC6 finally crystal clear. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 660–661 (2016).
73. Zhang, Y. *et al.* HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J.* **22**, 1168–1179 (2003).
74. Asthana, J., Kapoor, S., Mohan, R. & Panda, D. Inhibition of HDAC6 deacetylase activity increases its binding with microtubules and suppresses microtubule dynamic instability in MCF-7 cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 22516–22526 (2013).
75. Luxton, G. W. G. & Gundersen, G. G. HDAC6-pack: cortactin acetylation joins the brew. *Dev. Cell* **13**, 161–162 (2007).
76. Noack, M., Leyk, J. & Richter-Landsberg, C. HDAC6 inhibition results in tau acetylation and modulates tau phosphorylation and degradation in oligodendrocytes. *Glia* **62**, 535–547 (2014).
77. Kovacs, J. J. *et al.* HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol. Cell* **18**, 601–607 (2005).
78. Biologists, C. of. HDAC6 in microtubule dynamics. *Journal of Cell Science* **122**, e1902–e1902 (2009).
79. Zhang, S.-L. *et al.* Histone deacetylase 6 is overexpressed and promotes tumor growth of colon cancer through regulation of the MAPK/ERK signal pathway. *Oncotargets Ther* **12**, 2409–2419 (2019).
80. Zhao, X. *et al.* The 2.5 Å crystal structure of the SIRT1 catalytic domain bound to nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) and an indole (EX527 analogue) reveals a novel mechanism of histone deacetylase inhibition. *J. Med. Chem.* **56**, 963–969 (2013).
81. Moore, L. D., Le, T. & Fan, G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* **38**, 23–38 (2013).
82. Epigénétique. *Inserm - La science pour la santé* <https://www.inserm.fr/information-enseignant/dossiers-information/epigenetique>.

83. Lehrmann, H., Pritchard, L. L. & Harel-Bellan, A. Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. *Adv. Cancer Res.* **86**, 41–65 (2002).
84. Mai, A. *et al.* Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy. *Med Res Rev* **25**, 261–309 (2005).
85. Dupont, C., Armant, D. R. & Brenner, C. A. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin. Reprod. Med.* **27**, 351–357 (2009).
86. Xu, W. S., Parmigiani, R. B. & Marks, P. A. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* **26**, 5541–5552 (2007).
87. Carrier, F. Chromatin Modulation by Histone Deacetylase Inhibitors: Impact on Cellular Sensitivity to Ionizing Radiation. *Mol Cell Pharmacol* **5**, 51–59 (2013).
88. Workman, J. L. Nucleosome displacement in transcription. *Genes Dev.* **20**, 2009–2017 (2006).
89. Park, S.-Y. & Kim, J.-S. A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes. *Exp. Mol. Med.* **52**, 204–212 (2020).
90. Ehrenhofer-Murray, A. E. Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2335–2349 (2004).
91. Wade, P. A. Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 693–698 (2001).
92. Strahl, B. D. & Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41–45 (2000).
93. Yoshida, M. *et al.* Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **48 Suppl 1**, S20-26 (2001).
94. Roth, S. Y., Denu, J. M. & Allis, C. D. Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 81–120 (2001).
95. Yang, X.-J. Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays* **26**, 1076–1087 (2004).
96. Kadosh, D. & Struhl, K. Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell* **89**, 365–371 (1997).
97. Robert, F. *et al.* Global position and recruitment of HATs and HDACs in the yeast genome. *Mol. Cell* **16**, 199–209 (2004).
98. Xie, J. *et al.* Sum1 and Hst1 repress middle sporulation-specific gene expression during mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **18**, 6448–6454 (1999).
99. Berger, S. L. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**, 407–412 (2007).
100. Xu, L., Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 140–147 (1999).
101. Kurdistani, S. K., Robyr, D., Tavazoie, S. & Grunstein, M. Genome-wide binding map of the histone deacetylase Rpd3 in yeast. *Nat. Genet.* **31**, 248–254 (2002).

102. Wang, A., Kurdistani, S. K. & Grunstein, M. Requirement of Hos2 histone deacetylase for gene activity in yeast. *Science* **298**, 1412–1414 (2002).
103. Vidal, M. & Gaber, R. F. RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 6317–6327 (1991).
104. Vidal, M., Strich, R., Esposito, R. E. & Gaber, R. F. RPD1 (SIN3/UME4) is required for maximal activation and repression of diverse yeast genes. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 6306–6316 (1991).
105. Chou, C.-W., Wu, M.-S., Huang, W.-C. & Chen, C.-C. HDAC inhibition decreases the expression of EGFR in colorectal cancer cells. *PLoS ONE* **6**, e18087 (2011).
106. Kim, Y. J. *et al.* HDAC inhibitors induce transcriptional repression of high copy number genes in breast cancer through elongation blockade. *Oncogene* **32**, 2828–2835 (2013).
107. Scott, G. K., Marden, C., Xu, F., Kirk, L. & Benz, C. C. Transcriptional repression of ErbB2 by histone deacetylase inhibitors detected by a genomically integrated ErbB2 promoter-reporting cell screen. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 385–392 (2002).
108. Wang, Z. *et al.* Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell* **138**, 1019–1031 (2009).
109. Josling, G. A., Selvarajah, S. A., Petter, M. & Duffy, M. F. The role of bromodomain proteins in regulating gene expression. *Genes (Basel)* **3**, 320–343 (2012).
110. Peserico, A. & Simone, C. Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 371832 (2011).
111. Yoshida, M., Kudo, N., Kosono, S. & Ito, A. Chemical and structural biology of protein lysine deacetylases. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.* **93**, 297–321 (2017).
112. Peng, L. & Seto, E. Deacetylation of nonhistone proteins by HDACs and the implications in cancer. *Handb Exp Pharmacol* **206**, 39–56 (2011).
113. Zhang, J. *et al.* Lysine acetylation is a highly abundant and evolutionarily conserved modification in *Escherichia coli*. *Mol. Cell Proteomics* **8**, 215–225 (2009).
114. Reed, S. M. & Quelle, D. E. p53 Acetylation: Regulation and Consequences. *Cancers (Basel)* **7**, 30–69 (2014).
115. Liu, L. *et al.* p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1202–1209 (1999).
116. Tang, Y., Luo, J., Zhang, W. & Gu, W. Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol. Cell* **24**, 827–839 (2006).
117. Gu, W. & Roeder, R. G. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**, 595–606 (1997).
118. Legube, G. *et al.* Role of the histone acetyl transferase Tip60 in the p53 pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 44825–44833 (2004).

119. Dohmesen, C., Koepfel, M. & Dobbelstein, M. Specific inhibition of Mdm2-mediated neddylation by Tip60. *Cell Cycle* **7**, 222–231 (2008).
120. Juan, L. J. *et al.* Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation. *J. Biol. Chem.* **275**, 20436–20443 (2000).
121. Vaziri, H. *et al.* hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* **107**, 149–159 (2001).
122. Subramanian, C., Jarzembowski, J. A., Opihari, A. W., Castle, V. P. & Kwok, R. P. S. HDAC6 deacetylates Ku70 and regulates Ku70-Bax binding in neuroblastoma. *Neoplasia* **13**, 726–734 (2011).
123. Yeung, F. *et al.* Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* **23**, 2369–2380 (2004).
124. Faiola, F. *et al.* Dual regulation of c-Myc by p300 via acetylation-dependent control of Myc protein turnover and coactivation of Myc-induced transcription. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 10220–10234 (2005).
125. Glozak, M. A., Sengupta, N., Zhang, X. & Seto, E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* **363**, 15–23 (2005).
126. Brunet, A. *et al.* Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* **303**, 2011–2015 (2004).
127. Picard, F. *et al.* Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* **429**, 771–776 (2004).
128. Sahakian, E., Woan, W. V., Villagra, A. & Sotomayor, E. M. Epigenetic Approaches: Emerging Role of Histone Deacetylase Inhibitors in Cancer Immunotherapy. *Cancer Immunotherapy: Immune Suppression and Tumor Growth: Second Edition* 353–372 (2013) doi:10.1016/B978-0-12-394296-8.00022-1.
129. Zheng, K., Jiang, Y., He, Z., Kitazato, K. & Wang, Y. Cellular defence or viral assist: the dilemma of HDAC6. *J. Gen. Virol.* **98**, 322–337 (2017).
130. Li, L. & Yang, X.-J. Tubulin acetylation: responsible enzymes, biological functions and human diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 4237–4255 (2015).
131. Xu, Z. *et al.* Microtubules acquire resistance from mechanical breakage through intraluminal acetylation. *Science* **356**, 328–332 (2017).
132. Serrador, J. M. *et al.* HDAC6 deacetylase activity links the tubulin cytoskeleton with immune synapse organization. *Immunity* **20**, 417–428 (2004).
133. Li, L. *et al.* MEC-17 deficiency leads to reduced α -tubulin acetylation and impaired migration of cortical neurons. *J. Neurosci.* **32**, 12673–12683 (2012).
134. Zhang, X. *et al.* HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol. Cell* **27**, 197–213 (2007).

135. Messaoudi, K. *et al.* Critical role of the HDAC6–cortactin axis in human megakaryocyte maturation leading to a proplatelet-formation defect. *Nat Commun* **8**, 1–17 (2017).
136. Choi, S. J. *et al.* HDAC6 regulates cellular viral RNA sensing by deacetylation of RIG-I. *EMBO J.* **35**, 429–442 (2016).
137. Liu, H. M. *et al.* Regulation of Retinoic Acid Inducible Gene-I (RIG-I) Activation by the Histone Deacetylase 6. *EBioMedicine* **9**, 195–206 (2016).
138. Huo, L. *et al.* Regulation of Tat acetylation and transactivation activity by the microtubule-associated deacetylase HDAC6. *J. Biol. Chem.* **286**, 9280–9286 (2011).
139. Zhu, J., Coyne, C. B. & Sarkar, S. N. PKC alpha regulates Sendai virus-mediated interferon induction through HDAC6 and β -catenin. *EMBO J.* **30**, 4838–4849 (2011).
140. Gao, Y., Hubbert, C. C. & Yao, T.-P. The microtubule-associated histone deacetylase 6 (HDAC6) regulates epidermal growth factor receptor (EGFR) endocytic trafficking and degradation. *J. Biol. Chem.* **285**, 11219–11226 (2010).
141. Parmigiani, R. B. *et al.* HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 9633–9638 (2008).
142. Riolo, M. T. *et al.* Histone deacetylase 6 (HDAC6) deacetylates survivin for its nuclear export in breast cancer. *J. Biol. Chem.* **287**, 10885–10893 (2012).
143. Zhang, L. *et al.* Proteomic identification and functional characterization of MYH9, Hsc70, and DNAJA1 as novel substrates of HDAC6 deacetylase activity. *Protein Cell* **6**, 42–54 (2015).
144. Chang, Y.-W. *et al.* Deacetylation of HSPA5 by HDAC6 leads to GP78-mediated HSPA5 ubiquitination at K447 and suppresses metastasis of breast cancer. *Oncogene* **35**, 1517–1528 (2016).
145. Chang, Y. W. *et al.* Correction: Deacetylation of HSPA5 by HDAC6 leads to GP78-mediated HSPA5 ubiquitination at K447 and suppresses metastasis of breast cancer. *Oncogene* **39**, 946–949 (2020).
146. Medler, T. R. *et al.* HDAC6 Deacetylates HMGN2 to Regulate Stat5a Activity and Breast Cancer Growth. *Mol. Cancer Res.* **14**, 994–1008 (2016).
147. Nakka, K. K. *et al.* Nuclear matrix-associated protein SMAR1 regulates alternative splicing via HDAC6-mediated deacetylation of Sam68. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, E3374–3383 (2015).
148. Mortenson, J. B. *et al.* Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Promotes the Pro-survival Activity of 14-3-3 ζ via Deacetylation of Lysines within the 14-3-3 ζ Binding Pocket. *J Biol Chem* **290**, 12487–12496 (2015).
149. Yang, M. H. *et al.* HDAC6 and SIRT2 regulate the acetylation state and oncogenic activity of mutant K-RAS. *Mol. Cancer Res.* **11**, 1072–1077 (2013).
150. Wu, J.-Y., Moses, N., Bai, W. & Zhang, X. M. Implications of the HDAC6-ERK1 feed-forward loop in immunotherapy. *J Immunol Sci* **2**, 59–68 (2018).

151. Wu, J.-Y. *et al.* Histone deacetylase 6 (HDAC6) deacetylates extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) and thereby stimulates ERK1 activity. *J. Biol. Chem.* **293**, 1976–1993 (2018).
152. Ding, H., Dolan, P. J. & Johnson, G. V. W. Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. *J. Neurochem.* **106**, 2119–2130 (2008).
153. Microtubules - Latest research and news | Nature. <https://www.nature.com/subjects/microtubules>.
154. Szyk, A. *et al.* Molecular basis for age-dependent microtubule acetylation by tubulin acetyltransferase. *Cell* **157**, 1405–1415 (2014).
155. Akella, J. S. *et al.* MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. *Nature* **467**, 218–222 (2010).
156. Reed, N. A. *et al.* Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr. Biol.* **16**, 2166–2172 (2006).
157. Dompierre, J. P. *et al.* Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J. Neurosci.* **27**, 3571–3583 (2007).
158. Giustiniani, J. *et al.* Tubulin acetylation favors Hsp90 recruitment to microtubules and stimulates the signaling function of the Hsp90 clients Akt/PKB and p53. *Cell. Signal.* **21**, 529–539 (2009).
159. Sudo, H. & Baas, P. W. Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by katanin in neurons and fibroblasts. *J. Neurosci.* **30**, 7215–7226 (2010).
160. Topalidou, I. *et al.* Genetically separable functions of the MEC-17 tubulin acetyltransferase affect microtubule organization. *Curr. Biol.* **22**, 1057–1065 (2012).
161. Cueva, J. G., Hsin, J., Huang, K. C. & Goodman, M. B. Posttranslational acetylation of α -tubulin constrains protofilament number in native microtubules. *Curr. Biol.* **22**, 1066–1074 (2012).
162. Portran, D., Schaedel, L., Xu, Z., Théry, M. & Nachury, M. V. Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. *Nat. Cell Biol.* **19**, 391–398 (2017).
163. Wloga, D., Joachimiak, E., Louka, P. & Gaertig, J. Posttranslational Modifications of Tubulin and Cilia. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**, (2017).
164. Ishiguro, K., Ando, T., Maeda, O., Watanabe, O. & Goto, H. Cutting edge: tubulin α functions as an adaptor in NFAT-importin β interaction. *J. Immunol.* **186**, 2710–2713 (2011).
165. Mackeh, R. *et al.* Reactive oxygen species, AMP-activated protein kinase, and the transcription cofactor p300 regulate α -tubulin acetyltransferase-1 (α TAT-1/MEC-17)-dependent microtubule hyperacetylation during cell stress. *J. Biol. Chem.* **289**, 11816–11828 (2014).
166. Misawa, T. *et al.* Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* **14**, 454–460 (2013).
167. Wang, B. *et al.* Microtubule acetylation amplifies p38 kinase signalling and anti-inflammatory IL-10 production. *Nat Commun* **5**, 3479 (2014).
168. Sabo, Y. *et al.* HIV-1 induces the formation of stable microtubules to enhance early infection. *Cell Host Microbe* **14**, 535–546 (2013).
169. Pandey, K. & Sharma, S. K. Activity- and memory training-induced acetylation of α -tubulin in the hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* **171**, 107226 (2020).

170. Cosen-Binker, L. I. & Kapus, A. Cortactin: the gray eminence of the cytoskeleton. *Physiology (Bethesda)* **21**, 352–361 (2006).
171. Ito, A. *et al.* The subcellular localization and activity of cortactin is regulated by acetylation and interaction with Keap1. *Sci Signal* **8**, ra120 (2015).
172. Zhang, Y. *et al.* Deacetylation of cortactin by SIRT1 promotes cell migration. *Oncogene* **28**, 445–460 (2009).
173. Kim, J.-Y., Hwang, H.-G., Lee, J.-Y., Kim, M. & Kim, J.-Y. Cortactin deacetylation by HDAC6 and SIRT2 regulates neuronal migration and dendrite morphogenesis during cerebral cortex development. *Mol Brain* **13**, 105 (2020).
174. Boyault, C. *et al.* HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates. *Genes Dev.* **21**, 2172–2181 (2007).
175. Pandey, U. B. *et al.* HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* **447**, 859–863 (2007).
176. Iwata, A., Riley, B. E., Johnston, J. A. & Kopito, R. R. HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J. Biol. Chem.* **280**, 40282–40292 (2005).
177. Richter-Landsberg, C. & Leyk, J. Inclusion body formation, macroautophagy, and the role of HDAC6 in neurodegeneration. *Acta Neuropathol.* **126**, 793–807 (2013).
178. Lee, J.-Y. & Yao, T.-P. Quality control autophagy: a joint effort of ubiquitin, protein deacetylase and actin cytoskeleton. *Autophagy* **6**, 555–557 (2010).
179. Lee, J.-Y. *et al.* HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO J.* **29**, 969–980 (2010).
180. Liu, K.-P. *et al.* LC3B-II deacetylation by histone deacetylase 6 is involved in serum-starvation-induced autophagic degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **441**, 970–975 (2013).
181. Seigneurin-Berny, D. *et al.* Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 8035–8044 (2001).
182. Rumpf, S. & Jentsch, S. Functional division of substrate processing cofactors of the ubiquitin-selective Cdc48 chaperone. *Mol. Cell* **21**, 261–269 (2006).
183. Voisine, C., Orton, K. & Morimoto, R. I. Protein Misfolding, Chaperone Networks, and the Heat Shock Response in the Nervous System. *Molecular Neurology* 59–76 (2007) doi:10.1016/B978-012369509-3.50007-X.
184. Dayalan Naidu, S. & Dinkova-Kostova, A. T. Regulation of the mammalian heat shock factor 1. *FEBS J.* **284**, 1606–1627 (2017).
185. van den Boom, J. & Meyer, H. VCP/p97-Mediated Unfolding as a Principle in Protein Homeostasis and Signaling. *Mol. Cell* **69**, 182–194 (2018).
186. Boyault, C. *et al.* HDAC6-p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover. *EMBO J.* **25**, 3357–3366 (2006).

187. Narita, T., Weinert, B. T. & Choudhary, C. Functions and mechanisms of non-histone protein acetylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 156–174 (2019).
188. Karolczak-Bayatti, M. *et al.* Acetylation of heat shock protein 20 (Hsp20) regulates human myometrial activity. *J. Biol. Chem.* **286**, 34346–34355 (2011).
189. George, P. *et al.* Combination of the histone deacetylase inhibitor LBH589 and the hsp90 inhibitor 17-AAG is highly active against human CML-BC cells and AML cells with activating mutation of FLT-3. *Blood* **105**, 1768–1776 (2005).
190. Rao, R. *et al.* HDAC6 inhibition enhances 17-AAG--mediated abrogation of hsp90 chaperone function in human leukemia cells. *Blood* **112**, 1886–1893 (2008).
191. Kim, E. K. & Choi, E.-J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1802**, 396–405 (2010).
192. Ryu, H.-W., Shin, D.-H., Lee, D. H., Won, H.-R. & Kwon, S. H. A potent hydroxamic acid-based, small-molecule inhibitor A452 preferentially inhibits HDAC6 activity and induces cytotoxicity toward cancer cells irrespective of p53 status. *Carcinogenesis* **39**, 72–83 (2018).
193. Fell, V. L. & Schild-Poulter, C. Ku regulates signaling to DNA damage response pathways through the Ku70 von Willebrand A domain. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 76–87 (2012).
194. Gong, P. *et al.* HDAC and Ku70 axis- an effective target for apoptosis induction by a new 2-cyano-3-oxo-1,9-dien glycyrrhetic acid analogue. *Cell Death Dis* **9**, 623 (2018).
195. Kerr, E. *et al.* Identification of an acetylation-dependant Ku70/FLIP complex that regulates FLIP expression and HDAC inhibitor-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* **19**, 1317–1327 (2012).
196. Li, Y. & Seto, E. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**, a026831 (2016).
197. Minamiya, Y. *et al.* Strong expression of HDAC3 correlates with a poor prognosis in patients with adenocarcinoma of the lung. *Tumour Biol* **31**, 533–539 (2010).
198. Min, S. K. *et al.* Expression of HAT1 and HDAC1, 2, 3 in Diffuse Large B-Cell Lymphomas, Peripheral T-Cell Lymphomas, and NK/T-Cell Lymphomas. *Korean J Pathol* **46**, 142–150 (2012).
199. Dallavalle, S., Pisano, C. & Zunino, F. Development and therapeutic impact of HDAC6-selective inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **84**, 756–765 (2012).
200. Yang, P. H., Zhang, L., Zhang, Y. J., Zhang, J. & Xu, W. F. HDAC6: physiological function and its selective inhibitors for cancer treatment. *Drug Discov Ther* **7**, 233–242 (2013).
201. Gao, X., Shen, L., Li, X. & Liu, J. Efficacy and toxicity of histone deacetylase inhibitors in relapsed/refractory multiple myeloma: Systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Exp Ther Med* **18**, 1057–1068 (2019).
202. Pride, D. A. & Summers, A. R. The emergence of specific HDAC inhibitors and their clinical efficacy in the treatment of hematologic malignancies and breast cancer. *International Journal of Molecular Biology: Open Access* **3**, (2018).

203. Shah, R. R. Safety and Tolerability of Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors in Oncology. *Drug Saf* **42**, 235–245 (2019).
204. Cengiz Seval, G. & Beksac, M. A comparative safety review of histone deacetylase inhibitors for the treatment of myeloma. *Expert Opin Drug Saf* **18**, 563–571 (2019).
205. Micelli, C. & Rastelli, G. Histone deacetylases: structural determinants of inhibitor selectivity. *Drug Discov. Today* **20**, 718–735 (2015).
206. Zhang, L. *et al.* Trend of histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: isoform selectivity or multitargeted strategy. *Med Res Rev* **35**, 63–84 (2015).
207. Vogl, D. T. *et al.* Ricolinostat, the First Selective Histone Deacetylase 6 Inhibitor, in Combination with Bortezomib and Dexamethasone for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *Clin. Cancer Res.* **23**, 3307–3315 (2017).
208. Raje, N. S. *et al.* Ricolinostat (ACY-1215), the First Selective HDAC6 Inhibitor, Combines Safely with Pomalidomide and Dexamethasone and Shows Promising Early Results in Relapsed-and-Refractory Myeloma (ACE-MM-102 Study). *Blood* **126**, 4228–4228 (2015).
209. Raje, N. *et al.* ACY-1215, a Selective Histone Deacetylase (HDAC) 6 Inhibitor: Interim Results Of Combination Therapy With Bortezomib In Patients With Multiple Myeloma (MM). *Blood* **122**, 759–759 (2013).
210. Vogl, D. T. *et al.* Phase 1B Results of Ricolinostat (ACY-1215) Combination Therapy with Bortezomib and Dexamethasone in Patients with Relapsed or Relapsed and Refractory Multiple Myeloma (MM). *Blood* **124**, 4764–4764 (2014).
211. Niesvizky, R. *et al.* Selective HDAC6 Inhibitor ACY-241, an Oral Tablet, Combined with Pomalidomide and Dexamethasone: Safety and Efficacy of Escalation and Expansion Cohorts in Patients with Relapsed or Relapsed-and-Refractory Multiple Myeloma (ACE-MM-200 Study). *Blood* **128**, 3307–3307 (2016).
212. Lee, E. K. *et al.* Results of an abbreviated Phase Ib study of the HDAC6 inhibitor ricolinostat and paclitaxel in recurrent ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer. *Gynecol Oncol Rep* **29**, 118–122 (2019).
213. Gordon, M. S. *et al.* A phase 1b study of the safety, pharmacokinetics, and preliminary antitumor activity of citarinostat (ACY-241) in combination with paclitaxel (Pac) in patients (pts) with advanced solid tumors (AST). *JCO* **36**, 2547–2547 (2018).
214. Santo, L. *et al.* Preclinical activity, pharmacodynamic, and pharmacokinetic properties of a selective HDAC6 inhibitor, ACY-1215, in combination with bortezomib in multiple myeloma. *Blood* **119**, 2579–2589 (2012).
215. Won, H.-R. *et al.* HDAC6-selective inhibitor synergistically enhances the anticancer activity of immunomodulatory drugs in multiple myeloma. *Int. J. Oncol.* **55**, 499–512 (2019).

216. Whitehill, G. D. *et al.* Immunomodulatory Effects of HDACi in Combination with Checkpoint Blockade and Lenalidomide in the Immunosuppressive Multiple Myeloma Bone Marrow Microenvironment. *Blood* **130**, 4422–4422 (2017).
217. Ray, A. *et al.* Combination of a novel HDAC6 inhibitor ACY-241 and anti-PD-L1 antibody enhances anti-tumor immunity and cytotoxicity in multiple myeloma. *Leukemia* **32**, 843–846 (2018).
218. Laino, A. S. *et al.* HDAC6 selective inhibition of melanoma patient T-cells augments anti-tumor characteristics. *J Immunother Cancer* **7**, 33 (2019).
219. Knox, T. *et al.* Selective HDAC6 inhibitors improve anti-PD-1 immune checkpoint blockade therapy by decreasing the anti-inflammatory phenotype of macrophages and down-regulation of immunosuppressive proteins in tumor cells. *Sci Rep* **9**, 6136 (2019).
220. Krukowski, K. *et al.* HDAC6 inhibition effectively reverses chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Pain* **158**, 1126–1137 (2017).
221. Van Helleputte, L. *et al.* Inhibition of histone deacetylase 6 (HDAC6) protects against vincristine-induced peripheral neuropathies and inhibits tumor growth. *Neurobiol. Dis.* **111**, 59–69 (2018).
222. Raje, N. *et al.* Rocilinostat (ACY-1215), a Selective HDAC6 Inhibitor, Alone and in Combination with Bortezomib in Multiple Myeloma: Preliminary Results From the First-in-Humans Phase I/II Study. *Blood* **120**, 4061–4061 (2012).
223. Yee, A. J. *et al.* Ricolinostat plus lenalidomide, and dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma: a multicentre phase 1b trial. *Lancet Oncol.* **17**, 1569–1578 (2016).
224. Kalinsky, K. *et al.* Phase IB trial of ACY-1215 (Ricolinostat) combined with nab-paclitaxel in metastatic breast cancer. *JCO* **36**, 1058–1058 (2018).
225. Awad, M. M. *et al.* Phase Ib study: Selective histone deacetylase (HDAC) inhibitor ACY-241 + nivolumab (Nivo) in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *JCO* **37**, 9029–9029 (2019).
226. Amengual, J. E. *et al.* First-in-Class Selective HDAC6 Inhibitor (ACY-1215) Has a Highly Favorable Safety Profile in Patients with Relapsed and Refractory Lymphoma. *Oncologist* **26**, 184-e366 (2021).
227. Nandakumar, S. K., Ulirsch, J. C. & Sankaran, V. G. Advances in understanding erythropoiesis: evolving perspectives. *Br J Haematol* **173**, 206–218 (2016).
228. King, A. J. & Higgs, D. R. Potential new approaches to the management of the Hb Bart's hydrops fetalis syndrome: the most severe form of α -thalassemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2018**, 353–360 (2018).
229. Baron, M. H. Concise Review: early embryonic erythropoiesis: not so primitive after all. *Stem Cells* **31**, 849–856 (2013).
230. Blobel, G. A. *et al.* An international effort to cure a global health problem: A report on the 19th Hemoglobin Switching Conference. *Exp Hematol* **43**, 821–837 (2015).
231. Palis, J. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Front Physiol* **5**, 3 (2014).

232. AbuSamra, D. B. *et al.* Not just a marker: CD34 on human hematopoietic stem/progenitor cells dominates vascular selectin binding along with CD44. *Blood Adv* **1**, 2799–2816 (2017).
233. Ivanovs, A. *et al.* Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region. *J Exp Med* **208**, 2417–2427 (2011).
234. Dzierzak, E. & Speck, N. A. Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* **9**, 129–136 (2008).
235. Ng, A. P. & Alexander, W. S. Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell Death Discov* **3**, 17002 (2017).
236. Adolfsson, J. *et al.* Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythromegakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**, 295–306 (2005).
237. Notta, F. *et al.* Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science* **351**, aab2116 (2016).
238. Passegué, E., Wagers, A. J., Giuriato, S., Anderson, W. C. & Weissman, I. L. Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J Exp Med* **202**, 1599–1611 (2005).
239. Bakker, S. T. & Passegué, E. Resilient and resourceful: genome maintenance strategies in hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* **41**, 915–923 (2013).
240. Wilson, A., Laurenti, E. & Trumpp, A. Balancing dormant and self-renewing hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev* **19**, 461–468 (2009).
241. Ikonomi, N., Kühlwein, S. D., Schwab, J. D. & Kestler, H. A. Awakening the HSC: Dynamic Modeling of HSC Maintenance Unravels Regulation of the TP53 Pathway and Quiescence. *Front Physiol* **11**, 848 (2020).
242. Wright, D. E., Wagers, A. J., Gulati, A. P., Johnson, F. L. & Weissman, I. L. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* **294**, 1933–1936 (2001).
243. Bazinet, A. & Popradi, G. A general practitioner’s guide to hematopoietic stem-cell transplantation. *Curr Oncol* **26**, 187–191 (2019).
244. Okada, S. *et al.* Enrichment and characterization of murine hematopoietic stem cells that express c-kit molecule. *Blood* **78**, 1706–1712 (1991).
245. Sidney, L. E., Branch, M. J., Dunphy, S. E., Dua, H. S. & Hopkinson, A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells* **32**, 1380–1389 (2014).
246. Berenson, R. J. *et al.* Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood* **77**, 1717–1722 (1991).
247. Clarke, B. J. *et al.* Hemoglobin synthesis in human BFU-E and CFU-E-derived erythroid colonies. *Blood* **54**, 805–817 (1979).

248. Papayannopoulou, T. & Migliaccio, A. R. Chapter 26 - Biology of Erythropoiesis, Erythroid Differentiation, and Maturation. in *Hematology (Seventh Edition)* (eds. Hoffman, R. et al.) 297-320.e14 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-323-35762-3.00026-3.
249. Dzierzak, E. & Philipsen, S. Erythropoiesis: Development and Differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**, (2013).
250. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers.
<http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/globules-rouges-et-leur-pathologie/20-erythropoiese>.
251. Ji, P., Murata-Hori, M. & Lodish, H. F. Formation of mammalian erythrocytes: chromatin condensation and enucleation. *Trends Cell Biol* **21**, 409–415 (2011).
252. Mei, Y., Liu, Y. & Ji, P. Understanding terminal erythropoiesis: An update on chromatin condensation, enucleation, and reticulocyte maturation. *Blood Rev* **46**, 100740 (2021).
253. Grütz, G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 3–15 (2005).
254. Wong, P. *et al.* Gene induction and repression during terminal erythropoiesis are mediated by distinct epigenetic changes. *Blood* **118**, e128-138 (2011).
255. Ji, P., Yeh, V., Ramirez, T., Murata-Hori, M. & Lodish, H. F. Histone deacetylase 2 is required for chromatin condensation and subsequent enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts. *Haematologica* **95**, 2013–2021 (2010).
256. Jayapal, S. R. *et al.* Down-regulation of Myc is essential for terminal erythroid maturation. *J Biol Chem* **285**, 40252–40265 (2010).
257. Zhang, L., Flygare, J., Wong, P., Lim, B. & Lodish, H. F. miR-191 regulates mouse erythroblast enucleation by down-regulating Rik3 and Mxi1. *Genes Dev* **25**, 119–124 (2011).
258. Shearstone, J. R. *et al.* Global DNA demethylation during mouse erythropoiesis in vivo. *Science* **334**, 799–802 (2011).
259. Yu, Y. *et al.* High resolution methylome analysis reveals widespread functional hypomethylation during adult human erythropoiesis. *J Biol Chem* **288**, 8805–8814 (2013).
260. Malik, J., Lillis, J. A., Couch, T., Getman, M. & Steiner, L. A. The Methyltransferase Setd8 Is Essential for Erythroblast Survival and Maturation. *Cell Rep* **21**, 2376–2383 (2017).
261. Evertts, A. G. *et al.* H4K20 methylation regulates quiescence and chromatin compaction. *Mol Biol Cell* **24**, 3025–3037 (2013).
262. Feng, Y. *et al.* Early mammalian erythropoiesis requires the Dot1L methyltransferase. *Blood* **116**, 4483–4491 (2010).
263. Hattangadi, S. M. *et al.* Histones to the cytosol: exportin 7 is essential for normal terminal erythroid nuclear maturation. *Blood* **124**, 1931–1940 (2014).
264. Perkins, A. C., Sharpe, A. H. & Orkin, S. H. Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature* **375**, 318–322 (1995).

265. Siatecka, M. *et al.* Severe anemia in the Nan mutant mouse caused by sequence-selective disruption of erythroid Kruppel-like factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 15151–15156 (2010).
266. Cantú, I. *et al.* The mouse KLF1 Nan variant impairs nuclear condensation and erythroid maturation. *PLoS One* **14**, e0208659 (2019).
267. Zhao, B. *et al.* Nuclear Condensation during Mouse Erythropoiesis Requires Caspase-3-Mediated Nuclear Opening. *Dev Cell* **36**, 498–510 (2016).
268. Zhao, B. *et al.* Disruption of erythroid nuclear opening and histone release in myelodysplastic syndromes. *Cancer Med* **8**, 1169–1174 (2019).
269. Zermati, Y. *et al.* Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* **193**, 247–254 (2001).
270. Carlile, G. W., Smith, D. H. & Wiedmann, M. Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood* **103**, 4310–4316 (2004).
271. Gutiérrez, L., Caballero, N., Fernández-Calleja, L., Karkoulia, E. & Strouboulis, J. Regulation of GATA1 levels in erythropoiesis. *IUBMB Life* **72**, 89–105 (2020).
272. Ribeil, J.-A. *et al.* Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* **445**, 102–105 (2007).
273. Zhen, R. *et al.* Wdr26 regulates nuclear condensation in developing erythroblasts. *Blood* **135**, 208–219 (2020).
274. Geiduschek, J. B. & Singer, S. J. Molecular changes in the membranes of mouse erythroid cells accompanying differentiation. *Cell* **16**, 149–163 (1979).
275. Koury, S. T., Koury, M. J. & Bondurant, M. C. Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts. *J Cell Biol* **109**, 3005–3013 (1989).
276. Lee, J. C.-M. *et al.* Mechanism of protein sorting during erythroblast enucleation: role of cytoskeletal connectivity. *Blood* **103**, 1912–1919 (2004).
277. Liu, J., Guo, X., Mohandas, N., Chasis, J. A. & An, X. Membrane remodeling during reticulocyte maturation. *Blood* **115**, 2021–2027 (2010).
278. Rai, D., Wilson, A. M. & Moosavi, L. Histology, Reticulocytes. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2021).
279. McGrath, K. E., Bushnell, T. P. & Palis, J. Multispectral imaging of hematopoietic cells: where flow meets morphology. *J Immunol Methods* **336**, 91–97 (2008).
280. Yoshida, H. *et al.* Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature* **437**, 754–758 (2005).
281. Konstantinidis, D. G. *et al.* Signaling and cytoskeletal requirements in erythroblast enucleation. *Blood* **119**, 6118–6127 (2012).
282. Keerthivasan, G., Small, S., Liu, H., Wickrema, A. & Crispino, J. D. Vesicle trafficking plays a novel role in erythroblast enucleation. *Blood* **116**, 3331–3340 (2010).

283. Wang, J. *et al.* Mammalian erythroblast enucleation requires PI3K-dependent cell polarization. *J Cell Sci* **125**, 340–349 (2012).
284. Laan, L., Roth, S. & Dogterom, M. End-on microtubule-dynein interactions and pulling-based positioning of microtubule organizing centers. *Cell Cycle* **11**, 3750–3757 (2012).
285. Splinter, D. *et al.* Bicaudal D2, dynein, and kinesin-1 associate with nuclear pore complexes and regulate centrosome and nuclear positioning during mitotic entry. *PLoS Biol* **8**, e1000350 (2010).
286. Kobayashi, I. *et al.* Erythroblast enucleation is a dynein-dependent process. *Exp Hematol* **44**, 247–256.e12 (2016).
287. Ridley, A. J. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol* **16**, 522–529 (2006).
288. Ouled-Haddou, H. *et al.* A new role of glutathione peroxidase 4 during human erythroblast enucleation. *Blood Adv* **4**, 5666–5680 (2020).
289. Li, X. *et al.* Histone deacetylase 6 regulates cytokinesis and erythrocyte enucleation through deacetylation of formin protein mDia2. *Haematologica* **102**, 984–994 (2017).
290. Watanabe, S. *et al.* Loss of a Rho-regulated actin nucleator, mDia2, impairs cytokinesis during mouse fetal erythropoiesis. *Cell Rep* **5**, 926–932 (2013).
291. Ubukawa, K. *et al.* Cdc42 regulates cell polarization and contractile actomyosin rings during terminal differentiation of human erythroblasts. *Sci Rep* **10**, 11806 (2020).
292. Bessis, M. [Erythroblastic island, functional unity of bone marrow]. *Rev Hematol* **13**, 8–11 (1958).
293. Mohandas, N. & Prenant, M. Three-dimensional model of bone marrow. *Blood* **51**, 633–643 (1978).
294. Hom, J., Dulmovits, B. M., Mohandas, N. & Blanc, L. The erythroblastic island as an emerging paradigm in the anemia of inflammation. *Immunol Res* **63**, 75–89 (2015).
295. Chasis, J. A. & Mohandas, N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood* **112**, 470–478 (2008).
296. Yeo, J. H., Lam, Y. W. & Fraser, S. T. Cellular dynamics of mammalian red blood cell production in the erythroblastic island niche. *Biophys Rev* **11**, 873–894 (2019).
297. Hanspal, M., Smockova, Y. & Uong, Q. Molecular identification and functional characterization of a novel protein that mediates the attachment of erythroblasts to macrophages. *Blood* **92**, 2940–2950 (1998).
298. Rhodes, M. M., Kopsombut, P., Bondurant, M. C., Price, J. O. & Koury, M. J. Adherence to macrophages in erythroblastic islands enhances erythroblast proliferation and increases erythrocyte production by a different mechanism than erythropoietin. *Blood* **111**, 1700–1708 (2008).
299. Soni, S. *et al.* Absence of erythroblast macrophage protein (Emp) leads to failure of erythroblast nuclear extrusion. *J Biol Chem* **281**, 20181–20189 (2006).

300. Javan, G. T., Salhotra, A., Finley, S. J. & Soni, S. Erythroblast macrophage protein (Emp): Past, present, and future. *Eur J Haematol* **100**, 3–9 (2018).
301. 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* **181**, 411–415 (1995).
302. Lee, G. *et al.* Targeted gene deletion demonstrates that the cell adhesion molecule ICAM-4 is critical for erythroblastic island formation. *Blood* **108**, 2064–2071 (2006).
303. Nagata, S. DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu Rev Immunol* **23**, 853–875 (2005).
304. Xue, L., Galdass, M., Gnanapragasam, M. N., Manwani, D. & Bieker, J. J. Extrinsic and intrinsic control by EKLf (KLF1) within a specialized erythroid niche. *Development* **141**, 2245–2254 (2014).
305. Porcu, S. *et al.* Klf1 affects DNase II- α expression in the central macrophage of a fetal liver erythroblastic island: a non-cell-autonomous role in definitive erythropoiesis. *Mol Cell Biol* **31**, 4144–4154 (2011).
306. Li, W. *et al.* Identification and transcriptome analysis of erythroblastic island macrophages. *Blood* **134**, 480–491 (2019).
307. Chen, Y. *et al.* Epo receptor signaling in macrophages alters the splenic niche to promote erythroid differentiation. *Blood* **136**, 235–246 (2020).
308. Miyanishi, M. *et al.* Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* **450**, 435–439 (2007).
309. Toda, S., Segawa, K. & Nagata, S. MerTK-mediated engulfment of pyrenocytes by central macrophages in erythroblastic islands. *Blood* **123**, 3963–3971 (2014).
310. Nishi, C., Toda, S., Segawa, K. & Nagata, S. Tim4- and MerTK-mediated engulfment of apoptotic cells by mouse resident peritoneal macrophages. *Mol Cell Biol* **34**, 1512–1520 (2014).
311. Chasis, J. A., Prenant, M., Leung, A. & Mohandas, N. Membrane assembly and remodeling during reticulocyte maturation. *Blood* **74**, 1112–1120 (1989).
312. Johnstone, R. M. The Jeanne Manery-Fisher Memorial Lecture 1991. Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins. *Biochem Cell Biol* **70**, 179–190 (1992).
313. Waugh, R. E., Mantalaris, A., Bauserman, R. G., Hwang, W. C. & Wu, J. H. Membrane instability in late-stage erythropoiesis. *Blood* **97**, 1869–1875 (2001).
314. Griffiths, R. E. *et al.* The ins and outs of human reticulocyte maturation: autophagy and the endosome/exosome pathway. *Autophagy* **8**, 1150–1151 (2012).
315. Ovchinnikova, E., Agliandolo, F., von Lindern, M. & van den Akker, E. The Shape Shifting Story of Reticulocyte Maturation. *Front Physiol* **9**, 829 (2018).
316. Gallagher, P. G. Disorders of erythrocyte hydration. *Blood* **130**, 2699–2708 (2017).

317. Quarmyne, M.-O., Risinger, M., Linkugel, A., Frazier, A. & Joiner, C. Volume regulation and KCl cotransport in reticulocyte populations of sickle and normal red blood cells. *Blood Cells Mol Dis* **47**, 95–99 (2011).
318. Canessa, M., Fabry, M. E., Blumenfeld, N. & Nagel, R. L. Volume-stimulated, Cl(-)-dependent K⁺ efflux is highly expressed in young human red cells containing normal hemoglobin or HbS. *J Membr Biol* **97**, 97–105 (1987).
319. Joiner, C. H., Rettig, R. K., Jiang, M., Risinger, M. & Franco, R. S. Urea stimulation of KCl cotransport induces abnormal volume reduction in sickle reticulocytes. *Blood* **109**, 1728–1735 (2007).
320. Bize, I., Taher, S. & Brugnara, C. Regulation of K-Cl cotransport during reticulocyte maturation and erythrocyte aging in normal and sickle erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C31–38 (2003).
321. Bagriantsev, S. N., Gracheva, E. O. & Gallagher, P. G. Piezo proteins: regulators of mechanosensation and other cellular processes. *J Biol Chem* **289**, 31673–31681 (2014).
322. Cahalan, S. M. *et al.* Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume. *Elife* **4**, (2015).
323. Maher, A. D. & Kuchel, P. W. The Gárdos channel: a review of the Ca²⁺-activated K⁺ channel in human erythrocytes. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 1182–1197 (2003).
324. Liu, J., Mohandas, N. & An, X. Membrane assembly during erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* **18**, 133–138 (2011).
325. Mohandas, N. & Gallagher, P. G. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* **112**, 3939–3948 (2008).
326. van den Akker, E., Satchwell, T. J., Williamson, R. C. & Toyne, A. M. Band 3 multiprotein complexes in the red cell membrane; of mice and men. *Blood Cells Mol Dis* **45**, 1–8 (2010).
327. Satchwell, T. J. *et al.* Severe Ankyrin-R deficiency results in impaired surface retention and lysosomal degradation of RhAG in human erythroblasts. *Haematologica* **101**, 1018–1027 (2016).
328. Salomao, M. *et al.* Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: new insights into the structural organization of the red blood cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8026–8031 (2008).
329. Schmidt, O. & Teis, D. The ESCRT machinery. *Curr Biol* **22**, R116–120 (2012).
330. Hurley, J. H. & Emr, S. D. The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**, 277–298 (2006).
331. Pan, B. T., Teng, K., Wu, C., Adam, M. & Johnstone, R. M. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* **101**, 942–948 (1985).
332. Blanc, L. *et al.* The water channel aquaporin-1 partitions into exosomes during reticulocyte maturation: implication for the regulation of cell volume. *Blood* **114**, 3928–3934 (2009).
333. Savina, A., Fader, C. M., Damiani, M. T. & Colombo, M. I. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic* **6**, 131–143 (2005).

334. Savina, A., Furlán, M., Vidal, M. & Colombo, M. I. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem* **278**, 20083–20090 (2003).
335. Nguyen, D. B. *et al.* Characterization of Microvesicles Released from Human Red Blood Cells. *Cell Physiol Biochem* **38**, 1085–1099 (2016).
336. Hogan, C. J., Shpall, E. J. & Keller, G. Differential long-term and multilineage engraftment potential from subfractions of human CD34+ cord blood cells transplanted into NOD/SCID mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 413–418 (2002).
337. Majeti, R., Park, C. Y. & Weissman, I. L. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell* **1**, 635–645 (2007).
338. Wangen, J. R., Eidenschink Brodersen, L., Stolk, T. T., Wells, D. A. & Loken, M. R. Assessment of normal erythropoiesis by flow cytometry: important considerations for specimen preparation. *Int J Lab Hematol* **36**, 184–196 (2014).
339. Li, J. *et al.* Isolation and transcriptome analyses of human erythroid progenitors: BFU-E and CFU-E. *Blood* **124**, 3636–3645 (2014).
340. Ashley, R. J. *et al.* Steroid resistance in Diamond Blackfan anemia associates with p57Kip2 dysregulation in erythroid progenitors. *J Clin Invest* **130**, 2097–2110 (2020).
341. Fajtova, M., Kovarikova, A., Svec, P., Kankuri, E. & Sedlak, J. Immunophenotypic profile of nucleated erythroid progenitors during maturation in regenerating bone marrow. *Leuk Lymphoma* **54**, 2523–2530 (2013).
342. Wood, B. Multicolor immunophenotyping: human immune system hematopoiesis. *Methods Cell Biol* **75**, 559–576 (2004).
343. Borrione, P. *et al.* A biparametric flow cytometry analysis for the study of reticulocyte patterns of maturation. *Int J Lab Hematol* **32**, 65–73 (2010).
344. Loken, M. R., Shah, V. O., Dattilio, K. L. & Civin, C. I. Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development. *Blood* **69**, 255–263 (1987).
345. 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).
346. An, X. & Chen, L. Flow Cytometry (FCM) Analysis and Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) of Erythroid Cells. *Methods Mol Biol* **1698**, 153–174 (2018).
347. Love, P. E., Warzecha, C. & Li, L. Ldb1 complexes: the new master regulators of erythroid gene transcription. *Trends Genet* **30**, 1–9 (2014).
348. Pevny, L. *et al.* Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* **349**, 257–260 (1991).
349. Schlaeger, T. M., Mikkola, H. K. A., Gekas, C., Helgadottir, H. B. & Orkin, S. H. Tie2Cre-mediated gene ablation defines the stem-cell leukemia gene (SCL/tal1)-dependent window during hematopoietic stem-cell development. *Blood* **105**, 3871–3874 (2005).

350. Perkins, A. C., Sharpe, A. H. & Orkin, S. H. Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature* **375**, 318–322 (1995).
351. Kassouf, M. T. *et al.* Genome-wide identification of TAL1's functional targets: insights into its mechanisms of action in primary erythroid cells. *Genome Res* **20**, 1064–1083 (2010).
352. Tallack, M. R. *et al.* Novel roles for KLF1 in erythropoiesis revealed by mRNA-seq. *Genome Res* **22**, 2385–2398 (2012).
353. Wu, W. *et al.* Dynamics of the epigenetic landscape during erythroid differentiation after GATA1 restoration. *Genome Res* **21**, 1659–1671 (2011).
354. Cantor, A. B. & Orkin, S. H. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* **21**, 3368–3376 (2002).
355. Trainor, C. D., Ghirlando, R. & Simpson, M. A. GATA zinc finger interactions modulate DNA binding and transactivation. *J Biol Chem* **275**, 28157–28166 (2000).
356. Lee, H.-Y. *et al.* Controlling hematopoiesis through sumoylation-dependent regulation of a GATA factor. *Mol Cell* **36**, 984–995 (2009).
357. Lowry, J. A. & Mackay, J. P. GATA-1: one protein, many partners. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 6–11 (2006).
358. Moriguchi, T. & Yamamoto, M. A regulatory network governing Gata1 and Gata2 gene transcription orchestrates erythroid lineage differentiation. *Int. J. Hematol.* **100**, 417–424 (2014).
359. Fujiwara, Y., Browne, C. P., Cunniff, K., Goff, S. C. & Orkin, S. H. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12355–12358 (1996).
360. Green, A. R. & Begley, C. G. SCL and related hemopoietic helix-loop-helix transcription factors. *Int J Cell Cloning* **10**, 269–276 (1992).
361. Robb, L. *et al.* Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7075–7079 (1995).
362. Souroullas, G. P., Salmon, J. M., Sablitzky, F., Curtis, D. J. & Goodell, M. A. Adult hematopoietic stem and progenitor cells require either Lyl1 or Scl for survival. *Cell Stem Cell* **4**, 180–186 (2009).
363. Hall, M. A. *et al.* The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 992–997 (2003).
364. Siatecka, M. & Bieker, J. J. The multifunctional role of EKLF/KLF1 during erythropoiesis. *Blood* **118**, 2044–2054 (2011).
365. McConnell, B. B. & Yang, V. W. Mammalian Krüppel-like factors in health and diseases. *Physiol Rev* **90**, 1337–1381 (2010).
366. Miller, I. J. & Bieker, J. J. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Krüppel family of nuclear proteins. *Mol Cell Biol* **13**, 2776–2786 (1993).

367. Philipsen, S. & Suske, G. A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res* **27**, 2991–3000 (1999).
368. Turner, J. & Crossley, M. Mammalian Krüppel-like transcription factors: more than just a pretty finger. *Trends Biochem Sci* **24**, 236–240 (1999).
369. Frontelo, P. *et al.* Novel role for EKLF in megakaryocyte lineage commitment. *Blood* **110**, 3871–3880 (2007).
370. Hodge, D. *et al.* A global role for EKLF in definitive and primitive erythropoiesis. *Blood* **107**, 3359–3370 (2006).
371. Nuez, B., Michalovich, D., Bygrave, A., Ploemacher, R. & Grosveld, F. Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature* **375**, 316–318 (1995).
372. Benzeno, S. *et al.* Cyclin-dependent kinase inhibition by the KLF6 tumor suppressor protein through interaction with cyclin D1. *Cancer Res* **64**, 3885–3891 (2004).
373. Vicente, C., Conchillo, A., García-Sánchez, M. A. & Odero, M. D. The role of the GATA2 transcription factor in normal and malignant hematopoiesis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **82**, 1–17 (2012).
374. Fujiwara, Y., Chang, A. N., Williams, A. M. & Orkin, S. H. Functional overlap of GATA-1 and GATA-2 in primitive hematopoietic development. *Blood* **103**, 583–585 (2004).
375. Kaneko, H., Shimizu, R. & Yamamoto, M. GATA factor switching during erythroid differentiation. *Curr Opin Hematol* **17**, 163–168 (2010).
376. Grass, J. A. *et al.* GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 8811–8816 (2003).
377. Wadman, I. A. *et al.* The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J* **16**, 3145–3157 (1997).
378. Soler, E. *et al.* The genome-wide dynamics of the binding of Ldb1 complexes during erythroid differentiation. *Genes Dev* **24**, 277–289 (2010).
379. L, W.-W. *et al.* Structural basis of simultaneous recruitment of the transcriptional regulators LMO2 and FOG1/ZFPM1 by the transcription factor GATA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, (2011).
380. Li, L. *et al.* Nuclear adaptor Ldb1 regulates a transcriptional program essential for the maintenance of hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* **12**, 129–136 (2011).
381. Vatikioti, A., Karkoulia, E., Ioannou, M. & Strouboulis, J. Translational regulation and deregulation in erythropoiesis. *Exp Hematol* **75**, 11–20 (2019).
382. Narla, A. & Ebert, B. L. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* **115**, 3196–3205 (2010).

383. Mirabello, L. *et al.* Novel and known ribosomal causes of Diamond-Blackfan anaemia identified through comprehensive genomic characterisation. *J Med Genet* **54**, 417–425 (2017).
384. Gazda, H. T. *et al.* RNA and protein evidence for haplo-insufficiency in Diamond-Blackfan anaemia patients with RPS19 mutations. *Br J Haematol* **127**, 105–113 (2004).
385. Ebert, B. L. *et al.* Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* **451**, 335–339 (2008).
386. Dutt, S. *et al.* Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood* **117**, 2567–2576 (2011).
387. 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).
388. Khajuria, R. K. *et al.* Ribosome Levels Selectively Regulate Translation and Lineage Commitment in Human Hematopoiesis. *Cell* **173**, 90-103.e19 (2018).
389. Puigbò, P., Bravo, I. G. & Garcia-Vallve, S. CAIcal: a combined set of tools to assess codon usage adaptation. *Biol Direct* **3**, 38 (2008).
390. Boussaid, I. *et al.* Integrated analyses of transcriptome and proteome identify the rules of translation selectivity in RPS14-deficient cells. *Haematologica* **106**, 746–758 (2021).
391. Gastou, M. *et al.* The severe phenotype of Diamond-Blackfan anemia is modulated by heat shock protein 70. *Blood Adv* **1**, 1959–1976 (2017).
392. Abaza, I. & Gebauer, F. Trading translation with RNA-binding proteins. *RNA* **14**, 404–409 (2008).
393. Hu, W., Yuan, B. & Lodish, H. F. Cpeb4-mediated translational regulatory circuitry controls terminal erythroid differentiation. *Dev Cell* **30**, 660–672 (2014).
394. Alvarez-Dominguez, J. R., Zhang, X. & Hu, W. Widespread and dynamic translational control of red blood cell development. *Blood* **129**, 619–629 (2017).
395. Mills, E. W., Wangen, J., Green, R. & Ingolia, N. T. Dynamic Regulation of a Ribosome Rescue Pathway in Erythroid Cells and Platelets. *Cell Rep* **17**, 1–10 (2016).
396. Schechter, A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* **112**, 3927–3938 (2008).
397. Dailey, H. A. & Meissner, P. N. Erythroid heme biosynthesis and its disorders. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**, a011676 (2013).
398. Chiabrando, D., Mercurio, S. & Tolosano, E. Heme and erythropoiesis: more than a structural role. *Haematologica* **99**, 973–983 (2014).
399. Ajioka, R. S., Phillips, J. D. & Kushner, J. P. Biosynthesis of heme in mammals. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 723–736 (2006).
400. Lecha, M., Puy, H. & Deybach, J.-C. Erythropoietic protoporphyria. *Orphanet J Rare Dis* **4**, 19 (2009).

401. Holme, S. A., Worwood, M., Anstey, A. V., Elder, G. H. & Badminton, M. N. Erythropoiesis and iron metabolism in dominant erythropoietic protoporphyria. *Blood* **110**, 4108–4110 (2007).
402. Ducamp, S. *et al.* Sideroblastic anemia: molecular analysis of the ALAS2 gene in a series of 29 probands and functional studies of 10 missense mutations. *Hum Mutat* **32**, 590–597 (2011).
403. Bergmann, A. K. *et al.* Systematic molecular genetic analysis of congenital sideroblastic anemia: evidence for genetic heterogeneity and identification of novel mutations. *Pediatr Blood Cancer* **54**, 273–278 (2010).
404. Ye, H. & Rouault, T. A. Erythropoiesis and iron sulfur cluster biogenesis. *Adv Hematol* **2010**, 329394 (2010).
405. Nilsson, R. *et al.* Discovery of genes essential for heme biosynthesis through large-scale gene expression analysis. *Cell Metab* **10**, 119–130 (2009).
406. Camaschella, C. *et al.* The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood* **110**, 1353–1358 (2007).
407. Pondarré, C. *et al.* The mitochondrial ATP-binding cassette transporter Abcb7 is essential in mice and participates in cytosolic iron-sulfur cluster biogenesis. *Hum Mol Genet* **15**, 953–964 (2006).
408. Ducamp, S. & Fleming, M. D. The molecular genetics of sideroblastic anemia. *Blood* **133**, 59–69 (2019).
409. Allikmets, R. *et al.* Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum Mol Genet* **8**, 743–749 (1999).
410. Bekri, S. *et al.* Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation. *Blood* **96**, 3256–3264 (2000).
411. Maguire, A., Hellier, K., Hammans, S. & May, A. X-linked cerebellar ataxia and sideroblastic anaemia associated with a missense mutation in the ABC7 gene predicting V411L. *Br J Haematol* **115**, 910–917 (2001).
412. Ogawa, K. *et al.* Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *EMBO J* **20**, 2835–2843 (2001).
413. Itoh, K. *et al.* An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* **236**, 313–322 (1997).
414. Han, A. P. *et al.* Heme-regulated eIF2alpha kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency. *EMBO J* **20**, 6909–6918 (2001).
415. Han, A.-P., Fleming, M. D. & Chen, J.-J. Heme-regulated eIF2alpha kinase modifies the phenotypic severity of murine models of erythropoietic protoporphyria and beta-thalassemia. *J Clin Invest* **115**, 1562–1570 (2005).
416. Kilberg, M. S., Shan, J. & Su, N. ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends Endocrinol Metab* **20**, 436–443 (2009).

417. Suragani, R. N. V. S. *et al.* Heme-regulated eIF2 α kinase activated Atf4 signaling pathway in oxidative stress and erythropoiesis. *Blood* **119**, 5276–5284 (2012).
418. Hahn, C. K. & Lowrey, C. H. Induction of fetal hemoglobin through enhanced translation efficiency of γ -globin mRNA. *Blood* **124**, 2730–2734 (2014).
419. Hahn, C. K. & Lowrey, C. H. Eukaryotic initiation factor 2 α phosphorylation mediates fetal hemoglobin induction through a post-transcriptional mechanism. *Blood* **122**, 477–485 (2013).
420. Chen, J.-J. & Zhang, S. Heme-regulated eIF2 α kinase in erythropoiesis and hemoglobinopathies. *Blood* **134**, 1697–1707 (2019).
421. Rio, S. *et al.* Regulation of globin-heme balance in Diamond-Blackfan anemia by HSP70/GATA1. *Blood* **133**, 1358–1370 (2019).
422. Quatredeniens, M. *et al.* Iron Deficiency in Pulmonary Arterial Hypertension: A Deep Dive into the Mechanisms. *Cells* **10**, 477 (2021).
423. Brissot, P. *et al.* Haemochromatosis. *Nat Rev Dis Primers* **4**, 18016 (2018).
424. McKie, A. T. *et al.* An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* **291**, 1755–1759 (2001).
425. Gunshin, H. *et al.* Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388**, 482–488 (1997).
426. Laftah, A. H. *et al.* Haem and folate transport by proton-coupled folate transporter/haem carrier protein 1 (SLC46A1). *Br J Nutr* **101**, 1150–1156 (2009).
427. Klei, T. R. L., Meinderts, S. M., van den Berg, T. K. & van Bruggen, R. From the Cradle to the Grave: The Role of Macrophages in Erythropoiesis and Erythrophagocytosis. *Front Immunol* **8**, 73 (2017).
428. Canonne-Hergaux, F., Donovan, A., Delaby, C., Wang, H. & Gros, P. Comparative studies of duodenal and macrophage ferroportin proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**, G156-163 (2006).
429. Osaki, S., Johnson, D. A. & Frieden, E. The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum. *J Biol Chem* **241**, 2746–2751 (1966).
430. Vulpe, C. D. *et al.* Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet* **21**, 195–199 (1999).
431. Fillebeen, C. *et al.* Transferrin receptor 1 controls systemic iron homeostasis by fine-tuning hepcidin expression to hepatocellular iron load. *Blood* **133**, 344–355 (2019).
432. Nemeth, E. *et al.* Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* **306**, 2090–2093 (2004).
433. Nicolas, G. *et al.* 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* **98**, 8780–8785 (2001).
434. Policard, A. & Bessis, M. Micropinocytosis and rhopheocytosis. *Nature* **194**, 110–111 (1962).

435. Korolnek, T. & Hamza, I. Macrophages and iron trafficking at the birth and death of red cells. *Blood* **125**, 2893–2897 (2015).
436. Keel, S. B. *et al.* A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science* **319**, 825–828 (2008).
437. Richardson, D. R. & Ponka, P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta* **1331**, 1–40 (1997).
438. Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Galy, B. & Camaschella, C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* **142**, 24–38 (2010).
439. Kautz, L. *et al.* Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet* **46**, 678–684 (2014).
440. Tanno, T. *et al.* Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood* **114**, 181–186 (2009).
441. Tanno, T. *et al.* High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med* **13**, 1096–1101 (2007).
442. Casanovas, G. *et al.* The murine growth differentiation factor 15 is not essential for systemic iron homeostasis in phlebotomized mice. *Haematologica* **98**, 444–447 (2013).
443. Waalen, J., von Löhneysen, K., Lee, P., Xu, X. & Friedman, J. S. Erythropoietin, GDF15, IL6, hepcidin and testosterone levels in a large cohort of elderly individuals with anaemia of known and unknown cause. *Eur J Haematol* **87**, 107–116 (2011).
444. Zhang, D.-L., Ghosh, M. C., Ollivierre, H., Li, Y. & Rouault, T. A. Ferroportin deficiency in erythroid cells causes serum iron deficiency and promotes hemolysis due to oxidative stress. *Blood* **132**, 2078–2087 (2018).
445. Ghosh, M. C. *et al.* Deletion of iron regulatory protein 1 causes polycythemia and pulmonary hypertension in mice through translational derepression of HIF2 α . *Cell Metab* **17**, 271–281 (2013).
446. Kim, A. & Nemeth, E. New insights into iron regulation and erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* **22**, 199–205 (2015).
447. Rouault, T. A. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol* **2**, 406–414 (2006).
448. Kapitsinou, P. P. *et al.* Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. *Blood* **116**, 3039–3048 (2010).
449. Wilkinson, N. & Pantopoulos, K. IRP1 regulates erythropoiesis and systemic iron homeostasis by controlling HIF2 α mRNA translation. *Blood* **122**, 1658–1668 (2013).
450. Anderson, S. A. *et al.* The IRP1-HIF-2 α axis coordinates iron and oxygen sensing with erythropoiesis and iron absorption. *Cell Metab* **17**, 282–290 (2013).
451. Richardson, C. L. *et al.* Isocitrate ameliorates anemia by suppressing the erythroid iron restriction response. *J Clin Invest* **123**, 3614–3623 (2013).

452. Karayel, Ö. *et al.* Integrative proteomics reveals principles of dynamic phosphosignaling networks in human erythropoiesis. *Mol Syst Biol* **16**, e9813 (2020).
453. Wu, H., Klingmüller, U., Besmer, P. & Lodish, H. F. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* **377**, 242–246 (1995).
454. Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R. & Lodish, H. F. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* **83**, 59–67 (1995).
455. de Aberle, S. B. A study of the hereditary anaemia of mice. *American Journal of Anatomy* **40**, 219–249 (1927).
456. Ogawa, M. *et al.* Expression and function of c-Kit in fetal hemopoietic progenitor cells: transition from the early c-Kit-independent to the late c-Kit-dependent wave of hemopoiesis in the murine embryo. *Development* **117**, 1089–1098 (1993).
457. de Jong, M. O., Westerman, Y., Wagemaker, G. & Wognum, A. W. Coexpression of Kit and the receptors for erythropoietin, interleukin 6 and GM-CSF on hemopoietic cells. *Stem Cells* **15**, 275–285 (1997).
458. Geslain, R. *et al.* Distinct functions of erythropoietin and stem cell factor are linked to activation of mTOR kinase signaling pathway in human erythroid progenitors. *Cytokine* **61**, 329–335 (2013).
459. Pircher, T. J. *et al.* Integrative signaling by minimal erythropoietin receptor forms and c-Kit. *J Biol Chem* **276**, 8995–9002 (2001).
460. Tan, B. L., Hong, L., Munugalavadla, V. & Kapur, R. Functional and biochemical consequences of abrogating the activation of multiple diverse early signaling pathways in Kit. Role for Src kinase pathway in Kit-induced cooperation with erythropoietin receptor. *J Biol Chem* **278**, 11686–11695 (2003).
461. Sui, X., Krantz, S. B., You, M. & Zhao, Z. Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis. *Blood* **92**, 1142–1149 (1998).
462. Munugalavadla, V. & Kapur, R. Role of c-Kit and erythropoietin receptor in erythropoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol* **54**, 63–75 (2005).
463. Grebien, F. *et al.* Stat5 activation enables erythropoiesis in the absence of EpoR and Jak2. *Blood* **111**, 4511–4522 (2008).
464. Mulcahy, L. The erythropoietin receptor. *Semin Oncol* **28**, 19–23 (2001).
465. Livnah, O. *et al.* Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* **283**, 987–990 (1999).
466. Zhang, Y. *et al.* Erythropoietin action in stress response, tissue maintenance and metabolism. *Int J Mol Sci* **15**, 10296–10333 (2014).
467. Witthuhn, B. A. *et al.* JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* **74**, 227–236 (1993).

468. Funakoshi-Tago, M., Pelletier, S., Moritake, H., Parganas, E. & Ihle, J. N. Jak2 FERM domain interaction with the erythropoietin receptor regulates Jak2 kinase activity. *Mol Cell Biol* **28**, 1792–1801 (2008).
469. Remy, I., Wilson, I. A. & Michnick, S. W. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science* **283**, 990–993 (1999).
470. Bunn, H. F. Erythropoietin. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**, a011619 (2013).
471. Fisher, J. W. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**, 1–14 (2003).
472. Quelle, F. W. *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* **16**, 1622–1631 (1996).
473. Wierenga, A. T. J., Vogelzang, I., Eggen, B. J. L. & Vellenga, E. Erythropoietin-induced serine 727 phosphorylation of STAT3 in erythroid cells is mediated by a MEK-, ERK-, and MSK1-dependent pathway. *Exp Hematol* **31**, 398–405 (2003).
474. Zhao, W., Kitidis, C., Fleming, M. D., Lodish, H. F. & Ghaffari, S. Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood* **107**, 907–915 (2006).
475. Miura, Y., Miura, O., Ihle, J. N. & Aoki, N. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by the erythropoietin receptor. *J Biol Chem* **269**, 29962–29969 (1994).
476. Reich, N. C. STATs get their move on. *JAKSTAT* **2**, e27080 (2013).
477. Kiu, H. & Nicholson, S. E. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors* **30**, 88–106 (2012).
478. Burger, D., Xenocostas, A. & Feng, Q. P. Molecular basis of cardioprotection by erythropoietin. *Curr Mol Pharmacol* **2**, 56–69 (2009).
479. Dorritie, K. A., McCubrey, J. A. & Johnson, D. E. STAT transcription factors in hematopoiesis and leukemogenesis: opportunities for therapeutic intervention. *Leukemia* **28**, 248–257 (2014).
480. Darnell, J. E., Kerr, I. M. & Stark, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415–1421 (1994).
481. Meyer, T., Hendry, L., Begitt, A., John, S. & Vinkemeier, U. A single residue modulates tyrosine dephosphorylation, oligomerization, and nuclear accumulation of stat transcription factors. *J Biol Chem* **279**, 18998–19007 (2004).
482. Silva, M. *et al.* Erythropoietin can induce the expression of bcl-x(L) through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines. *J Biol Chem* **274**, 22165–22169 (1999).
483. Socolovsky, M. *et al.* Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood* **98**, 3261–3273 (2001).
484. Kerenyi, M. A. *et al.* Stat5 regulates cellular iron uptake of erythroid cells via IRP-2 and TfR-1. *Blood* **112**, 3878–3888 (2008).

485. Gillinder, K. R. *et al.* Direct targets of pSTAT5 signalling in erythropoiesis. *PLoS One* **12**, (2017).
486. Mason, J. M., Beattie, B. K., Liu, Q., Dumont, D. J. & Barber, D. L. The SH2 inositol 5-phosphatase Ship1 is recruited in an SH2-dependent manner to the erythropoietin receptor. *J Biol Chem* **275**, 4398–4406 (2000).
487. Hodges, V. M., Rainey, S., Lappin, T. R. & Maxwell, A. P. Pathophysiology of anemia and erythrocytosis. *Crit Rev Oncol Hematol* **64**, 139–158 (2007).
488. Arcasoy, M. O. & Jiang, X. Co-operative signalling mechanisms required for erythroid precursor expansion in response to erythropoietin and stem cell factor. *Br J Haematol* **130**, 121–129 (2005).
489. Osaki, M., Oshimura, M. & Ito, H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* **9**, 667–676 (2004).
490. Myklebust, J. H., Blomhoff, H. K., Rusten, L. S., Stokke, T. & Smeland, E. B. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is important for erythropoietin-induced erythropoiesis from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* **30**, 990–1000 (2002).
491. Bouscary, D. *et al.* Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. *Blood* **101**, 3436–3443 (2003).
492. Jafari, M., Ghadami, E., Dadkhah, T. & Akhavan-Niaki, H. PI3k/AKT signaling pathway: Erythropoiesis and beyond. *J Cell Physiol* **234**, 2373–2385 (2019).
493. Kale, J. *et al.* Phosphorylation switches Bax from promoting to inhibiting apoptosis thereby increasing drug resistance. *EMBO Rep* **19**, (2018).
494. Dai, Y., Jin, S., Li, X. & Wang, D. The involvement of Bcl-2 family proteins in AKT-regulated cell survival in cisplatin resistant epithelial ovarian cancer. *Oncotarget* **8**, 1354–1368 (2017).
495. Cardone, M. H. *et al.* Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**, 1318–1321 (1998).
496. Mares, J. M. *et al.* Erythropoietin activates the phosphorylated cAMP [adenosine 3'5' cyclic monophosphate] response element-binding protein pathway and attenuates delayed paraplegia after ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* **149**, 920–924 (2015).
497. Bai, D., Ueno, L. & Vogt, P. K. Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int J Cancer* **125**, 2863–2870 (2009).
498. Ogawara, Y. *et al.* Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J Biol Chem* **277**, 21843–21850 (2002).
499. Ghaffari, S. *et al.* AKT induces erythroid-cell maturation of JAK2-deficient fetal liver progenitor cells and is required for Epo regulation of erythroid-cell differentiation. *Blood* **107**, 1888–1891 (2006).
500. Missiroli, S. *et al.* Nuclear translocation of active AKT is required for erythroid differentiation in erythropoietin treated K562 erythroleukemia cells. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 570–577 (2009).

501. Kadri, Z. *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* **25**, 7412–7422 (2005).
502. Jiang, H. *et al.* Impaired Mitophagy of Nucleated Erythroid Cells Leads to Anemia in Patients with Myelodysplastic Syndromes. *Oxid Med Cell Longev* **2018**, 6328051 (2018).
503. Grosso, R., Fader, C. M. & Colombo, M. I. Autophagy: A necessary event during erythropoiesis. *Blood Rev* **31**, 300–305 (2017).
504. Zhou, J. *et al.* FOXO3 induces FOXO1-dependent autophagy by activating the AKT1 signaling pathway. *Autophagy* **8**, 1712–1723 (2012).
505. Zhao, Y. *et al.* Cytosolic FoxO1 is essential for the induction of autophagy and tumour suppressor activity. *Nat Cell Biol* **12**, 665–675 (2010).
506. Nho, R. S. & Hergert, P. FoxO3a and disease progression. *World J Biol Chem* **5**, 346–354 (2014).
507. Ren, H. Y., Komatsu, N., Shimizu, R., Okada, K. & Miura, Y. Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma 1 in a human erythropoietin-dependent cell line. *J Biol Chem* **269**, 19633–19638 (1994).
508. Huang, K. P. The mechanism of protein kinase C activation. *Trends Neurosci* **12**, 425–432 (1989).
509. von Lindern, M. *et al.* Protein kinase C alpha controls erythropoietin receptor signaling. *J Biol Chem* **275**, 34719–34727 (2000).
510. Myklebust, J. H., Smeland, E. B., Josefsen, D. & Sioud, M. Protein kinase C-alpha isoform is involved in erythropoietin-induced erythroid differentiation of CD34(+) progenitor cells from human bone marrow. *Blood* **95**, 510–518 (2000).
511. Kapur, R. & Zhang, L. A novel mechanism of cooperation between c-Kit and erythropoietin receptor. Stem cell factor induces the expression of Stat5 and erythropoietin receptor, resulting in efficient proliferation and survival by erythropoietin. *J Biol Chem* **276**, 1099–1106 (2001).
512. Haas, N. *et al.* Kit transduced signals counteract erythroid maturation by MAPK-dependent modulation of erythropoietin signaling and apoptosis induction in mouse fetal liver. *Cell Death Differ* **22**, 790–800 (2015).
513. Zhang, J. *et al.* Expression of oncogenic K-ras from its endogenous promoter leads to a partial block of erythroid differentiation and hyperactivation of cytokine-dependent signaling pathways. *Blood* **109**, 5238–5241 (2007).
514. Kawano, T. *et al.* Inactivation of ERK accelerates erythroid differentiation of K562 cells induced by herbimycin A and STI571 while activation of MEK1 interferes with it. *Mol Cell Biochem* **258**, 25–33 (2004).
515. Wandzioch, E., Edling, C. E., Palmer, R. H., Carlsson, L. & Hallberg, B. Activation of the MAP kinase pathway by c-Kit is PI-3 kinase dependent in hematopoietic progenitor/stem cell lines. *Blood* **104**, 51–57 (2004).

516. Lennartsson, J. *et al.* Phosphorylation of Shc by Src family kinases is necessary for stem cell factor receptor/c-kit mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway and c-fos induction. *Oncogene* **18**, 5546–5553 (1999).
517. Slavova-Azmanova, N. S. *et al.* Lyn kinase plays important roles in erythroid expansion, maturation and erythropoietin receptor signalling by regulating inhibitory signalling pathways that control survival. *Biochem J* **459**, 455–466 (2014).
518. Karur, V. G., Lowell, C. A., Besmer, P., Agosti, V. & Wojchowski, D. M. Lyn kinase promotes erythroblast expansion and late-stage development. *Blood* **108**, 1524–1532 (2006).
519. Ingley, E. *et al.* Lyn deficiency reduces GATA-1, EKLF and STAT5, and induces extramedullary stress erythropoiesis. *Oncogene* **24**, 336–343 (2005).
520. Harder, K. W. *et al.* Perturbed myelo/erythropoiesis in Lyn-deficient mice is similar to that in mice lacking the inhibitory phosphatases SHP-1 and SHIP-1. *Blood* **104**, 3901–3910 (2004).
521. Tomc, J. & Debeljak, N. Molecular Pathways Involved in the Development of Congenital Erythrocytosis. *Genes (Basel)* **12**, 1150 (2021).
522. Klingmüller, U., Lorenz, U., Cantley, L. C., Neel, B. G. & Lodish, H. F. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* **80**, 729–738 (1995).
523. Bittorf, T., Seiler, J., Zhang, Z., Jaster, R. & Brock, J. SHP1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates erythroid differentiation and suppression of apoptosis in J2E erythroleukemic cells. *Biol Chem* **380**, 1201–1209 (1999).
524. Maslah, N., Cassinat, B., Verger, E., Kiladjian, J.-J. & Velazquez, L. The role of LNK/SH2B3 genetic alterations in myeloproliferative neoplasms and other hematological disorders. *Leukemia* **31**, 1661–1670 (2017).
525. Fitau, J., Boulday, G., Coulon, F., Quillard, T. & Charreau, B. The adaptor molecule Lnk negatively regulates tumor necrosis factor-alpha-dependent VCAM-1 expression in endothelial cells through inhibition of the ERK1 and -2 pathways. *J Biol Chem* **281**, 20148–20159 (2006).
526. Kwon, S.-M. *et al.* Pivotal role of lnk adaptor protein in endothelial progenitor cell biology for vascular regeneration. *Circ Res* **104**, 969–977 (2009).
527. Wang, T.-C. *et al.* The adaptor protein SH2B3 (Lnk) negatively regulates neurite outgrowth of PC12 cells and cortical neurons. *PLoS One* **6**, e26433 (2011).
528. Velazquez, L. *et al.* Cytokine signaling and hematopoietic homeostasis are disrupted in Lnk-deficient mice. *J Exp Med* **195**, 1599–1611 (2002).
529. Li, Y., He, X., Schembri-King, J., Jakes, S. & Hayashi, J. Cloning and characterization of human Lnk, an adaptor protein with pleckstrin homology and Src homology 2 domains that can inhibit T cell activation. *J Immunol* **164**, 5199–5206 (2000).
530. Gery, S. *et al.* Adaptor protein Lnk negatively regulates the mutant MPL, MPLW515L associated with myeloproliferative disorders. *Blood* **110**, 3360–3364 (2007).

531. Tong, W., Zhang, J. & Lodish, H. F. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood* **105**, 4604–4612 (2005).
532. Simon, C. *et al.* Lnk adaptor protein down-regulates specific Kit-induced signaling pathways in primary mast cells. *Blood* **112**, 4039–4047 (2008).
533. Bersenev, A., Wu, C., Balcerek, J. & Tong, W. Lnk controls mouse hematopoietic stem cell self-renewal and quiescence through direct interactions with JAK2. *J Clin Invest* **118**, 2832–2844 (2008).
534. Baran-Marszak, F. *et al.* Expression level and differential JAK2-V617F-binding of the adaptor protein Lnk regulates JAK2-mediated signals in myeloproliferative neoplasms. *Blood* **116**, 5961–5971 (2010).
535. Takaki, S., Morita, H., Tezuka, Y. & Takatsu, K. Enhanced hematopoiesis by hematopoietic progenitor cells lacking intracellular adaptor protein, Lnk. *J Exp Med* **195**, 151–160 (2002).
536. Takaki, S. *et al.* Control of B cell production by the adaptor protein Lnk. Definition Of a conserved family of signal-modulating proteins. *Immunity* **13**, 599–609 (2000).
537. Gisselbrecht, S. Les protéines de la famille CIS-SOCS : des modulateurs des effets biologiques des cytokines. *The CIS-SOCS proteins : a new family of modulators of cytokine signalling* (1999) doi:10.4267/10608/1253.
538. Jegalian, A. G. & Wu, H. Differential roles of SOCS family members in EpoR signal transduction. *J Interferon Cytokine Res* **22**, 853–860 (2002).
539. Kazi, J. U., Kabir, N. N., Flores-Morales, A. & Rönstrand, L. SOCS proteins in regulation of receptor tyrosine kinase signaling. *Cell Mol Life Sci* **71**, 3297–3310 (2014).
540. Babon, J. J. *et al.* The SOCS box domain of SOCS3: structure and interaction with the elonginBC-cullin5 ubiquitin ligase. *J Mol Biol* **381**, 928–940 (2008).
541. Kim, Y. K. *et al.* Structural basis of intersubunit recognition in elongin BC-cullin 5-SOCS box ubiquitin-protein ligase complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **69**, 1587–1597 (2013).
542. Kamizono, S. *et al.* The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2. *J Biol Chem* **276**, 12530–12538 (2001).
543. Liau, N. P. D. *et al.* The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1. *Nat Commun* **9**, 1558 (2018).
544. Sasaki, A. *et al.* CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J Biol Chem* **275**, 29338–29347 (2000).
545. Hookham, M. B. *et al.* The myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant escapes negative regulation by suppressor of cytokine signaling 3. *Blood* **109**, 4924–4929 (2007).
546. Larsen, L. & Röpke, C. Suppressors of cytokine signalling: SOCS. *APMIS* **110**, 833–844 (2002).
547. Quentmeier, H. *et al.* SOCS2: inhibitor of JAK2V617F-mediated signal transduction. *Leukemia* **22**, 2169–2175 (2008).

548. Peltola, K. J. *et al.* Pim-1 kinase inhibits STAT5-dependent transcription via its interactions with SOCS1 and SOCS3. *Blood* **103**, 3744–3750 (2004).
549. Hirst, J. *et al.* Contributions of epsinR and gadkin to clathrin-mediated intracellular trafficking. *Mol Biol Cell* **26**, 3085–3103 (2015).
550. Sulahian, R., Cleaver, O. & Huang, L. J. Ligand-induced EpoR internalization is mediated by JAK2 and p85 and is impaired by mutations responsible for primary familial and congenital polycythemia. *Blood* **113**, 5287–5297 (2009).
551. Morrison, D. K. The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol* **19**, 16–23 (2009).
552. Jiang, J. *et al.* 14-3-3 regulates the LNK/JAK2 pathway in mouse hematopoietic stem and progenitor cells. *J Clin Invest* **122**, 2079–2091 (2012).
553. Spivak, J. L. Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management. *Blood* **100**, 4272–4290 (2002).
554. James, C. *et al.* A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144–1148 (2005).
555. Lu, X. & Chang, R. Polycythemia Vera. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2021).
556. Barbui, T. *et al.* Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* **29**, 761–770 (2011).
557. Spivak, J. L. & Silver, R. T. The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal. *Blood* **112**, 231–239 (2008).
558. Tefferi, A., Vannucchi, A. M. & Barbui, T. Polycythemia vera: historical oversights, diagnostic details, and therapeutic views. *Leukemia* **35**, 3339–3351 (2021).
559. Tefferi, A. *et al.* Mutation-enhanced international prognostic systems for essential thrombocythaemia and polycythaemia vera. *Br J Haematol* **189**, 291–302 (2020).
560. Tefferi, A. *et al.* Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Adv* **1**, 21–30 (2016).
561. Gery, S. *et al.* Lnk inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2 mutant, JAK2V617F. *J Leukoc Biol* **85**, 957–965 (2009).
562. Koren-Michowitz, M. *et al.* SH2B3 (LNK) mutations from myeloproliferative neoplasms patients have mild loss of function against wild type JAK2 and JAK2 V617F. *Br J Haematol* **161**, 811–820 (2013).
563. Bersenev, A. *et al.* Lnk constrains myeloproliferative diseases in mice. *J Clin Invest* **120**, 2058–2069 (2010).

564. Heideman, M. R. *et al.* Sin3a-associated Hdac1 and Hdac2 are essential for hematopoietic stem cell homeostasis and contribute differentially to hematopoiesis. *Haematologica* **99**, 1292–1303 (2014).
565. Wada, T. *et al.* Expression levels of histone deacetylases determine the cell fate of hematopoietic progenitors. *J Biol Chem* **284**, 30673–30683 (2009).
566. Elizalde, C. *et al.* Histone deacetylase 3 modulates the expansion of human hematopoietic stem cells. *Stem Cells Dev* **21**, 2581–2591 (2012).
567. Summers, A. R. *et al.* HDAC3 is essential for DNA replication in hematopoietic progenitor cells. *J Clin Invest* **123**, 3112–3123 (2013).
568. Bertrand, J. Y. *et al.* Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. *Nature* **464**, 108–111 (2010).
569. Wei, Y. *et al.* Ncor2 is required for hematopoietic stem cell emergence by inhibiting Fos signaling in zebrafish. *Blood* **124**, 1578–1585 (2014).
570. Ozawa, Y. *et al.* Histone deacetylase 3 associates with and represses the transcription factor GATA-2. *Blood* **98**, 2116–2123 (2001).
571. Hua, W.-K. *et al.* HDAC8 regulates long-term hematopoietic stem-cell maintenance under stress by modulating p53 activity. *Blood* **130**, 2619–2630 (2017).
572. Chute, J. P. Stem cell homing. *Curr Opin Hematol* **13**, 399–406 (2006).
573. Huang, X., Guo, B., Liu, S., Wan, J. & Broxmeyer, H. E. Neutralizing negative epigenetic regulation by HDAC5 enhances human haematopoietic stem cell homing and engraftment. *Nat Commun* **9**, 2741 (2018).
574. Roth, M., Wang, Z. & Chen, W. Y. Sirtuins in hematological aging and malignancy. *Crit Rev Oncog* **18**, 531–547 (2013).
575. Rimmelé, P. *et al.* Aging-like phenotype and defective lineage specification in SIRT1-deleted hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cell Reports* **3**, 44–59 (2014).
576. Brown, K. *et al.* SIRT3 reverses aging-associated degeneration. *Cell Rep* **3**, 319–327 (2013).
577. Wang, H. *et al.* SIRT6 Controls Hematopoietic Stem Cell Homeostasis through Epigenetic Regulation of Wnt Signaling. *Cell Stem Cell* **18**, 495–507 (2016).
578. Mohrin, M. *et al.* Stem cell aging. A mitochondrial UPR-mediated metabolic checkpoint regulates hematopoietic stem cell aging. *Science* **347**, 1374–1377 (2015).
579. Yamamura, K. *et al.* Pleiotropic role of histone deacetylases in the regulation of human adult erythropoiesis. *Br J Haematol* **135**, 242–253 (2006).
580. Kim, M. Y., Yan, B., Huang, S. & Qiu, Y. Regulating the Regulators: The Role of Histone Deacetylase 1 (HDAC1) in Erythropoiesis. *Int J Mol Sci* **21**, (2020).
581. Wang, P., Wang, Z. & Liu, J. Role of HDACs in normal and malignant hematopoiesis. *Mol Cancer* **19**, 5 (2020).

582. Chen, X. & Bieker, J. J. Stage-specific repression by the EKLF transcriptional activator. *Mol Cell Biol* **24**, 10416–10424 (2004).
583. Zhang, W., Kadam, S., Emerson, B. M. & Bieker, J. J. Site-specific acetylation by p300 or CREB binding protein regulates erythroid Krüppel-like factor transcriptional activity via its interaction with the SWI-SNF complex. *Mol Cell Biol* **21**, 2413–2422 (2001).
584. Suzuki, M., Yamada, T., Kihara-Negishi, F., Sakurai, T. & Oikawa, T. Direct association between PU.1 and MeCP2 that recruits mSin3A-HDAC complex for PU.1-mediated transcriptional repression. *Oncogene* **22**, 8688–8698 (2003).
585. Yang, T. *et al.* Acetylation of histone deacetylase 1 regulates NuRD corepressor complex activity. *J Biol Chem* **287**, 40279–40291 (2012).
586. Saleque, S., Kim, J., Rooke, H. M. & Orkin, S. H. Epigenetic regulation of hematopoietic differentiation by Gfi-1 and Gfi-1b is mediated by the cofactors CoREST and LSD1. *Mol Cell* **27**, 562–572 (2007).
587. Laurent, B. *et al.* A short Gfi-1B isoform controls erythroid differentiation by recruiting the LSD1-CoREST complex through the dimethylation of its SNAG domain. *J Cell Sci* **125**, 993–1002 (2012).
588. Jian, W., Yan, B., Huang, S. & Qiu, Y. Histone deacetylase 1 activates PU.1 gene transcription through regulating TAF9 deacetylation and transcription factor IID assembly. *FASEB J* **31**, 4104–4116 (2017).
589. Willcockson, M. A. *et al.* Runx1 promotes murine erythroid progenitor proliferation and inhibits differentiation by preventing Pu.1 downregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 17841–17847 (2019).
590. Pop, R. *et al.* A key commitment step in erythropoiesis is synchronized with the cell cycle clock through mutual inhibition between PU.1 and S-phase progression. *PLoS Biol* **8**, (2010).
591. Watamoto, K. *et al.* Altered interaction of HDAC5 with GATA-1 during MEL cell differentiation. *Oncogene* **22**, 9176–9184 (2003).
592. Delehanty, L. L., Bullock, G. C. & Goldfarb, A. N. Protein kinase D-HDAC5 signaling regulates erythropoiesis and contributes to erythropoietin cross-talk with GATA1. *Blood* **120**, 4219–4228 (2012).
593. Hung, H. L., Lau, J., Kim, A. Y., Weiss, M. J. & Blobel, G. A. CREB-Binding protein acetylates hematopoietic transcription factor GATA-1 at functionally important sites. *Mol Cell Biol* **19**, 3496–3505 (1999).
594. Varricchio, L. *et al.* Identification of NuRSERY, a new functional HDAC complex composed by HDAC5, GATA1, EKLF and pERK present in human erythroid cells. *Int J Biochem Cell Biol* **50**, 112–122 (2014).
595. Wang, Y. *et al.* Impairment of human terminal erythroid differentiation by histone deacetylase 5 deficiency. *Blood* **138**, 1615–1627 (2021).

596. Bottardi, S. *et al.* Ikaros and GATA-1 combinatorial effect is required for silencing of human gamma-globin genes. *Mol Cell Biol* **29**, 1526–1537 (2009).
597. Zhao, Q., Cumming, H., Cerruti, L., Cunningham, J. M. & Jane, S. M. Site-specific acetylation of the fetal globin activator NF-E4 prevents its ubiquitination and regulates its interaction with the histone deacetylase, HDAC1. *J Biol Chem* **279**, 41477–41486 (2004).
598. Mankidy, R. *et al.* Short-chain fatty acids induce gamma-globin gene expression by displacement of a HDAC3-NCoR repressor complex. *Blood* **108**, 3179–3186 (2006).
599. Pasricha, S.-R. *et al.* Hepcidin is regulated by promoter-associated histone acetylation and HDAC3. *Nat Commun* **8**, 403 (2017).
600. Muralidhar, S. A., Ramakrishnan, V., Kalra, I. S., Li, W. & Pace, B. S. Histone deacetylase 9 activates gamma-globin gene expression in primary erythroid cells. *J Biol Chem* **286**, 2343–2353 (2011).
601. Thon, J. N. & Italiano, J. E. Platelet formation. *Semin. Hematol.* **47**, 220–226 (2010).
602. Machlus, K. R., Thon, J. N. & Italiano, J. E. Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: a review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation. *British Journal of Haematology* **165**, 227–236 (2014).
603. Poulter, N. S. & Thomas, S. G. Cytoskeletal regulation of platelet formation: Coordination of F-actin and microtubules. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **66**, 69–74 (2015).
604. Bender, M. *et al.* Microtubule sliding drives proplatelet elongation and is dependent on cytoplasmic dynein. *Blood* **125**, 860–868 (2015).
605. Antkowiak, A. *et al.* Cdc42-dependent F-actin dynamics drive structuration of the demarcation membrane system in megakaryocytes. *J. Thromb. Haemost.* **14**, 1268–1284 (2016).
606. Italiano, J. E., Lecine, P., Shivdasani, R. A. & Hartwig, J. H. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J. Cell Biol.* **147**, 1299–1312 (1999).
607. Ali, A. *et al.* Thrombocytopenia induced by the histone deacetylase inhibitor abexinostat involves p53-dependent and -independent mechanisms. *Cell Death Dis* **4**, e738 (2013).
608. Yang, X.-J. & Seto, E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* **26**, 5310–5318 (2007).
609. Choudhary, C. *et al.* Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* **325**, 834–840 (2009).
610. Yang, X.-J. & Seto, E. Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol. Cell* **31**, 449–461 (2008).
611. Minucci, S. & Pelicci, P. G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 38–51 (2006).

612. Turtoi, A., Peixoto, P., Castronovo, V. & Bellahcène, A. Histone deacetylases and cancer-associated angiogenesis: current understanding of the biology and clinical perspectives. *Crit Rev Oncog* **20**, 119–137 (2015).
613. Wilting, R. H. *et al.* Overlapping functions of Hdac1 and Hdac2 in cell cycle regulation and haematopoiesis. *EMBO J* **29**, 2586–2597 (2010).
614. Bishton, M. J. *et al.* Deciphering the molecular and biologic processes that mediate histone deacetylase inhibitor-induced thrombocytopenia. *Blood* **117**, 3658–3668 (2011).
615. Caulier, A. *et al.* PIEZO1 activation delays erythroid differentiation of normal and hereditary xerocytosis-derived human progenitor cells. *Haematologica* **105**, 610–622 (2020).
616. Messaoudi, K. *et al.* Critical role of the HDAC6-cortactin axis in human megakaryocyte maturation leading to a proplatelet-formation defect. *Nat Commun* **8**, 1786 (2017).
617. Caulier, A. *et al.* PIEZO1 activation delays erythroid differentiation of normal and hereditary xerocytosis-derived human progenitor cells. *Haematologica* **105**, 610–622 (2020).
618. Ouled-Haddou, H. *et al.* A new role of glutathione peroxidase 4 during human erythroblast enucleation. *Blood Adv* **4**, 5666–5680 (2020).
619. Gautier, E.-F. *et al.* Comprehensive Proteomic Analysis of Human Erythropoiesis. *Cell Rep* **16**, 1470–1484 (2016).
620. Crispino, J. D. *et al.* Survivin Is Required for Terminal Differentiation of Erythroid Cells as Well as for the Proliferation and/or Survival of Hematopoietic Progenitors. *Blood* **108**, 81–81 (2006).
621. Wang, H. *et al.* Acetylation directs survivin nuclear localization to repress STAT3 oncogenic activity. *J. Biol. Chem.* **285**, 36129–36137 (2010).
622. Ghosh, A., Garee, G., Sweeny, E. A., Nakamura, Y. & Stuehr, D. J. Hsp90 chaperones hemoglobin maturation in erythroid and nonerythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**, E1117–E1126 (2018).
623. Mortenson, J. B. *et al.* Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Promotes the Pro-survival Activity of 14-3-3 ζ via Deacetylation of Lysines within the 14-3-3 ζ Binding Pocket. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 12487–12496 (2015).
624. Tong, W., Zhang, J. & Lodish, H. F. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood* **105**, 4604–4612 (2005).
625. Kihara-Negishi, F. *et al.* In vivo complex formation of PU.1 with HDAC1 associated with PU.1-mediated transcriptional repression. *Oncogene* **20**, 6039–6047 (2001).
626. Yan, B. *et al.* HDAC1 is required for GATA-1 transcription activity, global chromatin occupancy and hematopoiesis. *Nucleic Acids Res* **49**, 9783–9798 (2021).
627. Blobel, G. A., Nakajima, T., Eckner, R., Montminy, M. & Orkin, S. H. CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2061–2066 (1998).

628. Lamonica, J. M. *et al.* Bromodomain protein Brd3 associates with acetylated GATA1 to promote its chromatin occupancy at erythroid target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, E159-168 (2011).
629. Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M. & Philipsen, S. GATA1 Function, a Paradigm for Transcription Factors in Hematopoiesis. *Mol Cell Biol* **25**, 1215–1227 (2005).
630. Ho, N., Li, A., Li, S. & Zhang, H. Heat shock protein 90 and role of its chemical inhibitors in treatment of hematologic malignancies. *Pharmaceuticals (Basel)* **5**, 779–801 (2012).
631. Verstovsek, S. *et al.* Efficacy, safety, and survival with ruxolitinib in patients with myelofibrosis: results of a median 3-year follow-up of COMFORT-I. *Haematologica* **100**, 479–488 (2015).
632. Harrison, C. N. *et al.* Long-term findings from COMFORT-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis. *Leukemia* **30**, 1701–1707 (2016).
633. Patel, K. P. *et al.* Correlation of mutation profile and response in patients with myelofibrosis treated with ruxolitinib. *Blood* **126**, 790–797 (2015).
634. Newberry, K. J. *et al.* Clonal evolution and outcomes in myelofibrosis after ruxolitinib discontinuation. *Blood* **130**, 1125–1131 (2017).
635. Bose, P. & Verstovsek, S. Investigational histone deacetylase inhibitors (HDACi) in myeloproliferative neoplasms. *Expert Opin Investig Drugs* **25**, 1393–1403 (2016).
636. Golay, J. *et al.* The histone deacetylase inhibitor ITF2357 has anti-leukemic activity in vitro and in vivo and inhibits IL-6 and VEGF production by stromal cells. *Leukemia* **21**, 1892–1900 (2007).
637. Carta, S. *et al.* Histone deacetylase inhibitors prevent exocytosis of interleukin-1beta-containing secretory lysosomes: role of microtubules. *Blood* **108**, 1618–1626 (2006).
638. Bali, P. *et al.* Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* **280**, 26729–26734 (2005).
639. Citri, A. *et al.* Hsp90 recognizes a common surface on client kinases. *J Biol Chem* **281**, 14361–14369 (2006).
640. Hobbs, G. S. *et al.* Hsp90 inhibition disrupts JAK-STAT signaling and leads to reductions in splenomegaly in patients with myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* **103**, e5–e9 (2018).
641. Ihle, J. N. & Gilliland, D. G. Jak2: normal function and role in hematopoietic disorders. *Curr Opin Genet Dev* **17**, 8–14 (2007).
642. Ali, S., Nouhi, Z., Chughtai, N. & Ali, S. SHP-2 regulates SOCS-1-mediated Janus kinase-2 ubiquitination/degradation downstream of the prolactin receptor. *J Biol Chem* **278**, 52021–52031 (2003).
643. Guerini, V. *et al.* The histone deacetylase inhibitor ITF2357 selectively targets cells bearing mutated JAK2(V617F). *Leukemia* **22**, 740–747 (2008).
644. Yue, L. *et al.* HDAC11 deficiency disrupts oncogene-induced hematopoiesis in myeloproliferative neoplasms. *Blood* **135**, 191–207 (2020).

645. Nunomura, W. & Sawada, K. Survivin: a new player during erythroblast maturation. *Haematologica* **97**, 1456–1458 (2012).
646. Keerthivasan, G. *et al.* A novel role for survivin in erythroblast enucleation. *Haematologica* **97**, 1471–1479 (2012).
647. Pennington, K. L., Chan, T. Y., Torres, M. P. & Andersen, J. L. The dynamic and stress-adaptive signaling hub of 14-3-3: emerging mechanisms of regulation and context-dependent protein-protein interactions. *Oncogene* **37**, 5587–5604 (2018).
648. Yaffe, M. B. How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett* **513**, 53–57 (2002).
649. Rothblum-Oviatt, C. J., Ryan, C. E. & Piwnica-Worms, H. 14-3-3 binding regulates catalytic activity of human Wee1 kinase. *Cell Growth Differ* **12**, 581–589 (2001).
650. Fan, X. *et al.* 14-3-3 Proteins Are on the Crossroads of Cancer, Aging, and Age-Related Neurodegenerative Disease. *Int J Mol Sci* **20**, E3518 (2019).
651. Aghazadeh, Y. & Papadopoulos, V. The role of the 14-3-3 protein family in health, disease, and drug development. *Drug Discov Today* **21**, 278–287 (2016).
652. Chuang, M.-J. *et al.* The HDAC inhibitor LBH589 induces ERK-dependent prometaphase arrest in prostate cancer via HDAC6 inactivation and down-regulation. *PLoS One* **8**, e73401 (2013).
653. Stomski, F. C. *et al.* Identification of a 14-3-3 binding sequence in the common beta chain of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interleukin-3 (IL-3), and IL-5 receptors that is serine-phosphorylated by GM-CSF. *Blood* **94**, 1933–1942 (1999).
654. Yu, D. *et al.* miR-451 protects against erythroid oxidant stress by repressing 14-3-3zeta. *Genes Dev* **24**, 1620–1633 (2010).
655. McMullin, M. F. & Cario, H. LNK mutations and myeloproliferative disorders. *Am J Hematol* **91**, 248–251 (2016).

ANNEXES

Annexe I : Séquence de la protéine HDAC6

10	20	30	40	50
MTSTGQDSTT	TRQRRSRQNP	QSPPQDSSVT	SKRNIKKGAV	PRSIPNLAEV
60	70	80	90	100
KKKGKMKKLG	QAMEEDLIVG	LQGMDLNLEA	EALAGTGLVL	DEQLNEFHCL
110	120	130	140	150
WDDSFPEGPE	RLHAIKEQLI	QEGLLDRCVS	FQARFAEKEE	LMLVHSLEYI
160	170	180	190	200
DLMETTQYMN	EGELRVLADT	YDSVYLHPNS	YSCACLASGS	VLRLVDAVLG
210	220	230	240	250
AEIRNGMAII	RPPGHHAQHS	LMDGYCMFNH	VAVAARYAQQ	KHRIRRVLIV
260	270	280	290	300
DWDVHHGQGT	QFTFDQDPSV	LYFSIHRYEQ	GRFWPHLKAS	NWSTTGFGQG
310	320	330	340	350
QGYTINVPWN	QVGMRDADYI	AAFLHVLLPV	ALEFQPQLVL	VAAGFDALQG
360	370	380	390	400
DPKGEMAATP	AGFAQLTHLL	MGLAGGKLIL	SLEGGYNLRA	LAEGVSASLH
410	420	430	440	450
TLLGDPCPML	ESPGAPCRSA	QASVSCALEA	LEPFWEVLVR	STETVERDNM
460	470	480	490	500
EEDNVEESEE	EGPWEPVLP	ILTWPVLQSR	TGLVYDQNM	NHCNLWDSHH
510	520	530	540	550
PEVPQRILRI	MCRLEELGLA	GRCLTLPRP	ATEAELLTCH	SAEYVGH LRA
560	570	580	590	600
TEKMKTRELH	RESSNFDSIY	ICPSTFACAQ	LATGAACRLV	EAVLSGEVLN
610	620	630	640	650
GAAVVRPPGH	HAEQDAACGF	CFFNSVAVAA	RHAQTISGHA	LRILIVDWDV
660	670	680	690	700
HHGNGTQHMF	EDDPSVLYVS	LHRYDHGTFF	PMGDEGASSQ	IGRAAGTGFT
710	720	730	740	750
VNVAWNGPRM	GDADYLAAWH	RLVLPIAYEF	NPELVLSAG	FDAARGDPLG
760	770	780	790	800
GCQVSPEGYA	HLTHLLMGLA	SGRIILILEG	GYNLTSISES	MAACTRSLLG
810	820	830	840	850
DPPLLTLPR	PPLSGALASI	TETIQVHRRY	WRSLRVMKVE	DREGPSSSKL
860	870	880	890	900
VTKKAPQPAK	PRLAERMTRR	EKKVLEAGMG	KVTSASFGEE	STPGQTNSET
910	920	930	940	950
AVVALTQDQP	SEAATGGATL	AQTISEAAIG	GAMLGQTTSE	EAVGGATPDQ
960	970	980	990	1000

TTSEETVGGA 1010	ILDQTTSEDA 1020	VGGATLGQTT 1030	SEEAVGGATL 1040	AQTTSEAAME 1050
GATLDQTTSE 1060	EAPGGTELIQ 1070	TPLASSTDHQ 1080	TPPTSPVQGT 1090	TPQISPSTLI 1100
GSLRTLELGS 1110	ESQGASESQA 1120	PGEENLLGEA 1130	AGGQDMADSM 1140	LMQGSRGLTD 1150
QAIFYAVTPL 1160	PWCPhLVAVC 1170	PIPAAGLDVT 1180	QPCGDCGTIQ 1190	ENWVCLSCYQ 1200
VYCGRYINGH 1210	MLQHHGNSGH	PLVLSYIDLS	AWCYQCAYV	HHQALLDVKN
IAHQNKFGED MPPH				

La protéine HDAC6 connue sous le nom de HDAC6p131 a pour identifiant Q9UBN7 sur www.uniprot.com (séquence de 1215 acides aminés correspond au transcrit identifié ENST00000334136.11 sur la base de données génomiques www.ensembl.org).

Annexe II : Article 1 soumis à Journal of Cellular and Molecular Medicine

HDAC6 regulates human erythroid differentiation through modulation of JAK2 signalling

Running title: role of HDAC6 during human erythropoiesis

P. Vong^{1*}, K. Messaoudi^{1*}, N. Jankovsky¹, C. Gomilla¹, Y. Demont², A. Caulier^{1,3}, G. Jedraszak^{1,4}, Demagny^{1,2}, S. Djordjevic¹, T. Boyer^{1,2}, J.P. Marolleau^{1,3}, J. Rochette¹, H. Ouled-Haddou^{1*} et L. Garçon^{1,2*}

1. Université Picardie Jules Verne, HEMATIM UR4666, Amiens, France
2. Service d'Hématologie Biologique, Centre Hospitalier Universitaire, Amiens, France
3. Service des Maladies du Sang, Centre Hospitalier Universitaire, Amiens, France
4. Laboratoire de Génétique Constitutionnelle, Centre Hospitalier Universitaire, Amiens, France

* Equal contributions

1
2
3
4
5
6 **HDAC6 regulates human erythroid differentiation through modulation of JAK2 signalling**
7

8 Running title: role of HDAC6 during human erythropoiesis
9

10
11
12
13 P. Vong^{1*}, K. Messaoudi^{1*}, N. Jankovsky¹, C. Gomilla¹, Y. Demont², A. Caulier^{1,3}, G. Jedraszak^{1,4}, J.
14 Demagny^{1,2}, S. Djordjevic¹, T. Boyer^{1,2}, J.P. Marolleau^{1,3}, J. Rochette¹, H. Ouled-Haddou^{1*} et L.

15
16 Garçon^{1,2*}

- 17
18 1. Université Picardie Jules Verne, HEMATIM UR4666, Amiens, France
19 2. Service d'Hématologie Biologique, Centre Hospitalier Universitaire, Amiens, France
20 3. Service des Maladies du Sang, Centre Hospitalier Universitaire, Amiens, France
21 4. Laboratoire de Génétique Constitutionnelle, Centre Hospitalier Universitaire, Amiens, France
22
23
24
25
26

27 * Equal contributions
28
29
30

31 Corresponding author: Prof. Loïc Garçon, MD, PhD, service d'Hématologie Biologique, Centre de
32 Biologie Humaine, CHU Amiens, Amiens 80054 Cedex1, France et UR4666 HEMATIM, UPJV,
33 CURS, Amiens, France ; tel : 00(33)322087000 ; email : garconloic@gmail.com; fax :
34 00(33)322087059.
35
36
37
38

39 **Keywords:** HDAC, human erythropoiesis, JAK2 signaling

40 Abstract: 249 words.

41 Main text: 4053 words

42
43
44
45 Figures:7

46
47 Supplemental figures and tables: 3
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Ricolinostat (ACY-1215) is a selective inhibitor of the histone deacetylase HDAC6 with proven efficacy in the treatment of malignant diseases. Among histone deacetylases, HDAC6 is unusual in its cytoplasmic localization. Its inhibition leads to hyperacetylation of non-histone proteins, inhibiting cell cycle, proliferation and apoptosis. Anemia is one of the most frequent side effects observed with HDAC6 inhibitors. We investigated here the underlying mechanisms of this erythroid toxicity. We first confirmed that HDAC6 was strongly expressed at both RNA and protein levels in CD34⁺-cells-derived erythroid progenitors. ACY-1215 exposure on CD34⁺-cells driven *in vitro* towards the erythroid lineage led to a decreased cell count, an increased apoptotic rate and a delayed erythroid differentiation with accumulation of weakly hemoglobinized immature erythroblasts. This was accompanied by drastic changes in the transcriptomic profile of primary cells as shown by RNAseq. In erythroid cells, ACY-1215 and shRNA-mediated HDAC6 knockdown inhibited the EPO-dependent JAK2 phosphorylation. Using acetylome, we identified 14-3-3 ζ , known to interact directly with the JAK2 negative regulator LNK, as a potential HDAC6 target in erythroid cells. We confirmed that 14-3-3 ζ was hyperacetylated after ACY-1215 exposure, which decreased the 14-3-3 ζ /LNK interaction while increased LNK ability to interact with JAK2. Thus, in addition to its previously described role in the enucleation of mouse fetal liver erythroblasts, we identified here a new mechanism of HDAC6-dependent control of erythropoiesis through 14-3-3 ζ acetylation level, LNK availability and finally JAK2 activation in response to EPO, which is crucial downstream EPO-R activation for human erythroid cell survival, proliferation and differentiation.

Introduction

Numerous studies have highlighted the role of post-translational modifications in the regulation of cell proliferation, differentiation and death^{1,2}. Among these modifications, acetylation modifies the physico-chemical properties of proteins and modulates their activity, stability, localization and affinity for partner proteins. Acetylation and deacetylation are catalyzed by Histone Acetyl-Transferases (HAT) and Histone Deacetylases (HDACs) respectively. Through the deacetylation of a wide variety of functional and structural, nuclear and cytoplasmic proteins, HDACs modulate multiple cellular processes³⁻⁵. In humans, there are 18 HDACs classified according to their structural homology into 4 classes. The first class includes nuclear HDACs capable of deacetylating histones and transcription factors (HDAC1, 2, 3 and 8). Enzymes of the second class can shuttle between cytoplasmic-nucleus compartments. This class is subdivided into two subgroups: class IIa consisting of HDAC4, 5, 7 and 9 and class IIb consisting of HDAC6 and HDAC10. HDAC11 is the only member of HDAC class IV. Several studies have shown that HDAC expression and activity can be altered in several types of cancers where they stimulate cell proliferation and survival, promote angiogenesis and inhibit apoptosis. Currently, various HDAC inhibitors are being evaluated in clinical trials for the treatment of solid and hematological cancers as well as cardiac and neurodegenerative pathologies⁶⁻¹¹. Ricolinostat (ACY-1215) is a selective inhibitor of HDAC6 (HDAC6i) and has shown in phase I and II clinical trials its value in treating malignant diseases such as multiple myeloma, lymphoma and solid cancers¹²⁻¹⁵. Among histone deacetylases, HDAC6 is unusual in its cytoplasm location which facilitates its role in deacetylating various non histone protein targets such as α -tubulin, the chaperone protein HSP90 or Cortactin (CTTN)¹⁶⁻¹⁸. After exposure to chemical inhibitors, hyperacetylation of HDAC6 targets blocks the cell cycle, inhibits proliferation and induces apoptotic death. However, clinical trials highlighted frequent secondary effects observed with selective HDAC6i as monotherapy or in combination with other molecules, related to hyperacetylation of proteins in off target non-malignant cells. Among these off-target effects, one of the most frequent is hematological^{12-14,19-21}. Thrombocytopenia, occurring in around 13% of patients, is related to the inhibition of the HDAC6-CTTN axis, which plays a positive regulatory role in human megakaryocyte (MK) maturation. Indeed, CTTN hyperacetylation through HDAC6 inhibition decreases its ability to bind to F-actin, which inhibits MKs terminal differentiation²². Anemia is another frequent HDAC6i-induced toxicity, occurring in 9 to 20% of patients^{12,15,20}. However, its mechanism is poorly understood. In mice, the HDAC6-mDia2 axis is involved in the terminal stages of erythropoiesis, controlling cytokinesis and enucleation. Indeed, in mouse erythroblasts, mDia2 deacetylation through HDAC6 leads to its activation, contractile actin ring (CAR) formation and cytokinesis facilitating the extrusion of the nucleus, this axis being altered after HDAC6 knockdown or inhibition²³. Whether such mechanism also occurs during human erythropoiesis and is involved in the erythroid toxicity associated with HDAC6i is unknown. We present here an extensive study of HDAC6 expression and function

1
2
3 during *in vitro* erythroid differentiation of human CD34⁺ cells and show its involvement in regulating
4 the JAK2 signaling pathway, which is crucial downstream EPO-R activation for erythroid cell survival,
5 proliferation and differentiation.
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Methods

***In vitro* culture of human CD34⁺ erythroid cells and UT7/EPO cell line.**

CD34⁺ progenitor cells were isolated by positive selection kit (MiltenyiBiotec) using immunomagnetic beads cell-sorting system (AutoMACS; MiltenyiBiotec) from healthy leukapheresis samples, in agreement with our institutional ethics committee. CD34⁺ cells were cultivated as recently described²⁴ from day (D)1 to D6 in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) (Biochrom) supplemented with glutamine (Eurobio), containing 2% human AB serum (H2B), 100IU/ml penicillin (Eurobio), 100µg/ml streptomycin (Eurobio), 500µg/ml human holo-transferrin (Sigma-Aldrich), 10µg/ml recombinant human insulin (Sigma-Aldrich), 2IU/ml heparin (Braun), 100ng/ml human stem cell factor (SCF) (MiltenyiBiotec) and 3IU/ml erythropoietin (EPO) (Roche). From D7 to D20, cells were culture in the same medium but after SCF removal. UT7/EPO cells were maintained in α -minimum essential medium (MEM) (Dominique Dutscher) supplemented with 10% FCS (Eurobio) and 2 IU/mL EPO as recently described²⁵.

Flow cytometry (FCM)

Cells were washed and stained with appropriate panels of conjugated antibodies in 1X PBS plus 2mM EDTA and 0.5% BSA on ice. All conjugated antibodies and corresponding isotypes were supplied from MiltenyiBiotec. In all conditions, exclusion of non-viable cells was assessed using 7-amino-actinomycin D (7-AAD, MiltenyiBiotec) or DAPI (MiltenyiBiotec). Apoptosis was assessed using the Miltenyi Biotech kit according to the manufacturer's instructions. Acquisition was performed on a MACSQuant flow cytometer and analysis on FlowJo software.

Flow Imaging

Flow imaging was performed on ImageStream[®]X Mark II (Amnis/Luminex) using INPIRE[™] software (200.1.388.0). 1.10⁶ cells in 50µl 1X PBS were stained with human Anti-HDAC6 antibody. Cell analyses were performed on at least 10,000 cells at 60X magnification. Analysis was performed using IDEAS[™] software (6.2.64.0).

Lentiviral particles production and UT7/EPO cell transduction

ShRNA directed against HDAC6, described used in a previous report, were a kind gift of Dr Najet Debili (IGR, INSERM)²². Viral production and cell transduction were ensured as recently described²⁵.

UT7/EPO cells were infected using a MOI of 10; cells were washed 2 times in 1X PBS 48 hours after transduction and GFP positives cells were sorted using a FACSAria II (Becton Dickinson).

Immunoblots

1
2
3 Cells were harvested at 10^6 /mL per condition, washed in 1X PBS and lysed on ice in RIPA buffer
4 (Sigma) containing protease and phosphatase inhibitors cocktail (ThermoFisher). Lysates were gently
5 sonicated, centrifuged and protein concentration was quantified using Bradford assay (Interchim). After
6
7 standard procedures of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, nitrocellulose membrane transfer and
8 5% non-fat milk blocking, blotting was performed using 1/1000 diluted primary antibodies (references
9 in **Suppl. Table 2**). Bound primary antibodies were detected using anti-mouse (Sigma-Aldrich) or anti-
10 rabbit (ThermoFisher) horseradish peroxidase- conjugated secondary antibody. Revelation was
11 performed by enhanced chemiluminescent substrate (ThermoFisher) and signals were visualized using
12
13 Chemidoc Device (BioRad).
14
15
16
17
18

19 **Protein extraction for immunoprecipitation experiments:**

20 Protein acetylation was studied using immunoprecipitation (IP) experiments. Cells were lysed on ice in
21 an IP buffer (1% NP40, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 65mM Tris HCl pH 8, 50mM HEPES, 3% glycerol,
22 1mM orthovanadate, 10mM sodium butyrate, 1% Phosphatase inhibitors Cocktail and 1% Protease
23 Inhibitors Cocktail) for 20 min. Cell lysates were also sonicated three times and homogenized with a
24 pellet mixer (VWR®). After centrifugation of cell lysates at 10,000 rpm for 15 min at 4°C, the
25 supernatants were collected and the protein concentrations were determined by colorimetric based
26 assays (NanoPhotometer® Pearl).
27
28
29
30
31
32
33

34 **Immunoprecipitation, acetylation and protein-protein interactions analysis by immunoblot:**

35 Protein acetylation and protein-protein interactions were studied using immunoprecipitation (IP)
36 experiments. Cell lysates were incubated with an antibody directed against the protein of interest or an
37 IgG control antibody (2 µg) overnight at 4°C. On the following day, immunocomplexes were incubated
38 with 50µl µMACS Protein G Microbeads (MiltenyiBiotec) during 45 min at 4°C. The magnetically
39 tagged immunocomplexes were then isolated in µColumns (MiltenyiBiotec) according to the
40 manufacturer's instructions. Subsequently, an immunoblotting was performed to detect and characterize
41 the acetylation status of the protein of interest or to identify its partner proteins within the same complex.
42
43
44
45
46
47

48 **RQ-PCR**

49 Total RNA from fresh cells was isolated, treated with DNase I, using the RNeasy Mini Kit (Qiagen).
50 RNA quantity was determined with the NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher
51 Scientific). For each sample, 500 ng of RNA was subjected for reverse transcription reaction (Reverse
52 Transcription Kit, ThermoFisher). For the expression ratios of target genes vs. GAPDH housekeeping
53 gene, real time PCR was performed by power SYBR green assay (ThermoFisher). Primer sequences are
54 listed **Suppl. Table 3**. Experiments were realized in the Quant Studio 7 Detection Device (Applied
55 Biosystems), including dissociation curves setting. The comparative C_T method was used for
56
57 quantification of gene expression.
58
59
60

Cytospin for cytology, immunofluorescence microscopy

50.10³ cells were cytospun (Cytospin3, Shandon) onto glass slides (Matsunami). Cytological analysis was performed after May-Grünwald Giemsa (MGG) staining (Sigma) according to manufacturer's instruction. For fluorescent microscopy, 50.10³ cells were fixed with 1% paraformaldehyde (PFA, Thermofisher), permeabilized (Triton X100 0,1%, Sigma), washed by centrifugation (1500 rpm, 5 min) resuspended in 100 µl 1X PBS- 5%BSA. Cells were incubated overnight at 4°C with an anti-HDAC6 mouse primary antibody (1/100, sc-28386), then washed by centrifugation (1500 RPM, 5 min) and resuspended in 100 µl 1X PBS- 5%BSA. Staining was performed with an Alexa Fluor® 647 anti-mouse antibody (Thermofisher, A-21235) at room temperature for 1 h. After gentle washing followed by cytospin (300g, 5min), coverslip-attached erythroblasts were mounted onto glass plates using ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI (Thermofisher). Images were taken using an Axio Imager M2 ApoTome microscope running ZEN software (Zeiss, France).

Reagents

ACY-1215 was purchased from Selleckchem. Dilutions were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO).

RNA sequencing

Sequencing and bioinformatics analysis were performed by the Genomics and Bioinformatics facility (GBiM) from the U 1251/Marseille Medical Genetics lab. mRNA-Seq was performed on total RNA samples from primary erythroid cells at D10 of differentiation, with or without exposure to ACY-1215, in triplicate. Before sequencing, the quality of total RNA samples was assessed by using the Agilent bioanalyzer (Agilent, USA): only RNAs with RNA Integrity Numbers (RIN) above 8 were deemed suitable for sequencing and used for library preparation. For each sample, a library of stranded mRNA was prepared from 500 ng of total RNA after capture of RNA species with poly-A tail poly(A), using the Kapa mRNA HyperPrep kit (Roche, Switzerland), following the manufacturer's instructions. Indexed libraries were pooled and sequenced on an Illumina NextSeq 500 platform (75 bp paired-end sequencing).

Data processing and differential gene expression analysis

The quality of sequencing reads was assessed using fastQC²⁶. Raw sequencing reads were mapped to the human reference genome (Homo Sapiens genome assembly GRCh38 (hg38)) using STAR v2.5.3a²⁷ and bam files were indexed and sorted using Sambamba v0.6.6. After mapping, Number of reads per feature (GENCODE v34 annotations) was determined using Stringtie v1.3.1c²⁸. Differential gene expression analysis was performed using a Wald test thanks to the DESeq2 package²⁹. P-values were adjusted for multiple testing using the method by Benjamini and Hochberg: Only transcripts with an adjusted p-value (FDR, False Discovery Rate) below 0.05 were considered as significantly differentially

1
2
3 expressed. Differentially Expressed Genes (DEG) were visualized in the form of heatmaps generated
4 using the Pheatmap R package, or volcano plots, representing the Log₂FC (log₂ of the expression fold
5 change) and the adjusted p-value, prepared using the EnhancedVolcano R package. Preranked Gene set
6
7
8 Enrichment Analysis (GSEA) of DEGs was achieved with the GSEA software (Version 4.2.0).
9 Preranked GSEA was performed using Kolmogorov-Smirnov test and 1000 gene-set permutation.
10
11

12 **Statistical analysis**

13
14 Statistical analyses were performed using two-tailed p value and parametric tests. Statistical significance
15 used was $\alpha=0.05$. For quantitative variables, we used Student's t-test or one-way ANOVA test and
16 Tukey post-hoc analysis for multiparametric analysis. All numeric values as mean values \pm SD.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Results

HDAC6 is expressed and located in the cytoplasm of erythroid cells during *in vitro* human erythroid differentiation.

We used a previously published model of *in vitro* erythroid differentiation of CD34⁺ cells purified from apheresis²⁴ (**Fig. 1A**). We first quantified HDAC6 expression sequentially during erythroid differentiation. We observed a progressive increase in HDAC6 RNA expression raising from Day (D) 11 to D18 (**Fig. 1B**). At the protein level, we observed an earlier increase in HDAC6 expression at D6 of differentiation followed by a progressive decrease in the late stages of differentiation (**Fig. 1C**). This expression pattern and apparent discrepancy between RNA and protein level are in agreement with proteomic data of human erythropoiesis published by Gautier et al³⁰. We then assessed HDAC6 cellular localization during erythroid differentiation of human CD34⁺ cells using indirect immunofluorescence and flow imaging. As shown **Fig. 1D**, we observed that HDAC6 expression was mainly cytoplasmic at D8 arguing for non-histone and cytoplasmic targets at this step of erythropoiesis.

Effects of HDAC6 inhibition on the human *in vitro* erythroid differentiation.

We cultured CD34⁺-cells into *in vitro* driven erythroid differentiation in the presence of the HDAC6 pharmacological inhibitor: ACY-1215 from D6 to D10. We first evaluated the specificity of HDAC6i using Western blot by assessing the level of acetylation of tubulin (a primary target of HDAC6), and its selectivity by the level of acetylation of histone H3. We observed that 0.5 μ M ACY-1215 gave the best result in terms of HDAC6 inhibition, leading to an increased acetylated α -tubulin without affecting histone H3 acetylation (**Fig. 2A**). When CD34⁺ cells driven into erythroid differentiation were exposed to ACY-1215, HDAC6 pharmacological inhibition didn't affect the clonogenic potential of erythroid progenitors (data not shown). When added at D6, ACY-1215 significantly decreased cell count at D8 and D10 (**Fig. 2B**) and increased the apoptotic rate as shown by Annexin-V staining (**Fig. 2C**). We evaluated the effects of HDAC6 inhibition on erythroid differentiation using flow cytometry (CD71/GPA staining) and cytology. We observed at D10 a delay in erythroid differentiation with a decreased percentage of GPA^{High} cells (**Fig. 2D**). This delay in differentiation resulted in a decrease in hemoglobin synthesis with a cell pellet remaining barely red at D10 (**Fig. 2E**). Accordingly, MGG staining at D10 revealed an increase in immature erythroblasts at the expense of mature cells (**Fig. 2F**).

Delay in erythroid maturation induced by ACY-1215 occurs at transcriptomic level and is associated with a global modification of erythroid cell transcriptome.

By performing RQ-PCR analysis to assess key erythroid gene expression, we observed after ACY-1215 exposure an "immature" signature with an increased expression of *GATA2*, involved in early proliferative phase and a decreased expression of genes associated with late erythroid differentiation

1
2
3 such *HBA1* coding for the α -globin, *EPOR* and *GATA1* (**Fig. 3A**). The decrease in GPA expression
4 observed at cell surface by FCM after ACY-1215 exposure was confirmed at RNA level.
5 *GATA2/GATA1* ratio, a marker of balance between early proliferation/late differentiation phases, was
6 increased after HDAC6 inhibition (**Fig. 3B**). *GATA1* expression was also slightly reduced at protein
7 level (**Fig. 3C**). In order to better understand the transcriptomic modifications induced by ACY-1215,
8 we performed an RNAseq analysis on D10 erythroblasts exposed to 24h HDAC6i or DMSO. We
9 observed 1920 DEG including 1134 upregulated and 786 downregulated (**Fig. 3D-E**). Principal
10 component analysis (PCA) clearly separated cells exposed to ACY-1215 to those exposed to DMSO
11 indicating that HDAC6 inhibition induced a distinct expression pattern (data not shown). Rank-based
12 GSEA analysis showed a (i) significant enrichment of downregulated genes related to bone marrow
13 erythroblast associated with a downregulation of genes involved in heme metabolism, (ii) consistently
14 with the results obtained by RQ-PCR, a significant enrichment of downregulated *GATA1* targets as well
15 as E2F targets and (iii) an enrichment of downregulated genes related to cell cycle (**Fig. 3F**). Extensive
16 results of RNASeq are presented in supp data.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 **HDAC6 knockdown in the erythroleukemic cell line UT7/EPO repressed erythroid differentiation** 28 **at transcriptional level.**

29 In order to rule out any off-target effect of HDAC6i, we used a shRNA-mediated HDAC6 knockdown
30 in the erythroleukemic cell line UT7/EPO, a cell line which proliferates in the presence of EPO and
31 expresses a high basal level of HDAC6^{22,25}. This shRNA strategy induced a 50% decrease in HDAC6
32 expression at RNA and protein level (**Fig. 4A and 4B**). HDAC6 knockdown led to α -tubulin hyper
33 acetylation similarly to what was observed after ACY-1215-mediated chemical inhibition in primary
34 cells (**Fig 4C**). HDAC6 shRNA-mediated knockdown didn't induce apoptosis in UT7/EPO cells as
35 shown by Annexin-V staining (**Fig. 4D**) but decreased GPA expression at cell surface, as assessed by
36 FCM (**Fig 4E**) and at RNA level (**Fig. 4F**), consistently with what was observed in primary cells after
37 ACY-1215.
38
39
40
41
42
43
44
45

46 **HDAC6 knockdown in UT7/EPO and its inhibition in erythroid primary cells inhibited JAK2** 47 **phosphorylation in response to EPO stimulation.**

48 We used the UT7/EPO cell model to study the JAK2/STAT5 response to EPO stimulation after HDAC6
49 knockdown or chemical inhibition. HDAC6 inhibition decreased JAK2 phosphorylation in response to
50 EPO (**Fig. 5A and 5B**) as well as STAT5 activation (**Fig. 5C and 5D**), as assessed using immunoblot.
51 We then assessed the JAK2 response to EPO in human primary cells, by flow cytometry. We first
52 validated this method in UT7/EPO cells and confirmed the decreased JAK2 activation in response to
53 EPO in the same range than observed using immunoblot (**Fig. 5E**). In primary cells, we observed a
54 decreased p-JAK2 mean fluorescence intensity (MFI) after EPO stimulation, when cells were exposed
55
56
57
58
59
60

1
2
3 to ACY-1215 in comparison with DMSO, confirming a defective JAK2 signaling downstream EPO-R
4 stimulation in both cell models (**Fig. 5F**).

8 **14.3.3ζ acetylation regulation through HDAC6 activity regulates the JAK2/LNK interactions in** 9 **human erythroid cells.**

10
11 In order to identify HDAC6 targets in human erythropoiesis, we developed a “candidate” approach
12 selecting potential targets according to published data and to our own findings. We selected initially two
13 candidates: Survivin and HSP90. Survivin has been involved during murine erythropoiesis and has been
14 reported to be an HDCA6 target^{31,32}. HSP90 is also a known HDAC6 target. Its role in erythropoiesis
15 has been recently reported, through stabilization of immature, heme-free Hb-β and Hb-γ³³. However,
16 none of these two candidates were hyperacetylated in UT7/EPO cells after HDAC6 knockdown, ruling
17 out their involvement in the erythroid delay observed in human cells (**Suppl. Fig 1**). We then focused
18 on 14-3-3ζ since (i) 14-3-3ζ is a known HDAC6 targets in HEK cells and MDA-MB-231 breast cell
19 line³⁴ (ii) 14-3-3ζ interacts with LNK, a negative regulator of JAK2-mediated EPO signalling³⁵. We
20 assessed first its acetylation level in primary cells after ACY-1215 exposure. We performed 14-3-3ζ
21 immunoprecipitation followed by Western Blot using (i) an anti-acetyl lysine antibody and (ii) and anti-
22 14-3-3ζ antibody as a load control. HDAC6 knockdown induced 14-3-3ζ hyperacetylation (**Fig. 6A**).
23 We analyzed LNK/14-3-3ζ direct interactions first using 14-3-3ζ immunoprecipitation and revelation
24 with an anti-LNK antibody. As shown in **Fig. 6B**, ACY-1215 decreased the 14-3-3ζ /LNK interaction.
25 We then immunoprecipitated LNK and compared its interactions with JAK2 and 14-3-3ζ before and
26 after ACY-1215 exposure. We observed that ACY-1215 decreased LNK/14-3-3ζ interaction (**Fig. 6C**)
27 and adversely increased the LNK/JAK2 one (**Fig. 6D**). Taken together, these data showed that HDAC6
28 inhibition released LNK from its interaction with 14-3-3ζ, increasing its availability to interact with and
29 inhibit JAK2.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Discussion

Since expression and activity of HDACs are altered in many types of cancers³⁶, these enzymes appear to be interesting therapeutic targets, leading to the development of numerous chemical inhibitors. However, the majority of HDACi are non-selective, inhibiting multiple HDAC isozymes and have toxic off-target effects due to this broad activity. Among them, hematological toxicity including anemia is one of the most frequent^{12-14,19-21}. Several reports highlighted the role of HDACs in mice and human erythropoiesis. The HDACi FK228 and TSA decreased EPO-erythroid differentiation and induced apoptosis in a model of *in vitro* differentiation of human CD34⁺ cells, although neither the type of targeted HDAC neither the underlying mechanism were identified³⁷. HDAC1, a class I HDAC, regulates erythroid transcriptional program by interacting among corepressor complexes with transcription factors such as GATA1, Gfi-1B, TAL-1, PU-1, BCL-11a and KLF1, regulating their availability and activity during the erythroid differentiation³⁸⁻⁴³. The HDAC1/2 KO in hematopoietic cells is lethal in mice, leading to severe hematopoietic defects particularly predominant in the erythroid lineage with decreased maturation and increased apoptosis^{44,45}. HDAC2, another class I HDAC, plays a role in nuclear condensation and enucleation of late erythroblasts⁴⁶. Among class II HDAC, HDAC5 directly interacts with GATA1, repressing its transcriptional activity and differentiation of MEL cells⁴⁷. EPO alleviates GATA1 from this complex, leading to its acetylation, while HDAC5^{-/-} progenitors present enhanced erythroid differentiation⁴⁸. HDAC5 is part of the NuRSERY complex containing pERK and the transcription factors GATA1 and KLF1, favoring their nuclear import⁴⁹. HDAC5 deficiency impairs human erythroid differentiation through p53 and histone H4 hyperacetylation⁵⁰.

In the treatment of hematological malignancies, a key target among HDACs is class IIb HDAC6. Indeed, inhibition of HDAC6 induces the hyperacetylation of one of its well-identified targets, the chaperon protein HSP90, which plays an important role in the maintenance and functionality of key regulators of malignant hematopoiesis including mutant FLT3, Bcr-Abl fusion protein, and in the regulation of signaling proteins such as AKT, c-Raf and JAK2⁵¹. The ability of HDACi to regulate JAK2-dependant signaling pathways has been largely explored in myeloproliferative neoplasms carrying the constitutively active V617F mutation. Indeed, pan-HDAC inhibitors downregulate JAK2 V617F protein levels as well as the signaling pathways downstream, both in leukemic cell lines and in primary cells from patients^{52,53}. HSP90 hyperacetylation decreased its chaperon properties, inducing degradation of its target such as JAK2V617F⁵³. Considering the crucial role of JAK2 during erythropoiesis, it is therefore tempting to hypothesize that the anemia observed in patients treated with HDAC6i *in vivo*, and the defect in erythroid differentiation that we observed *in vitro* are related to an altered HSP90/JAK2 axis. However, in the UT7 leukemic cell line and in human primary erythroid cells, both expressing a

1
2
3 WT JAK2, we noticed that the total level of JAK2 remained unchanged, whereas its phosphorylation in
4 response to EPO was decreased. Besides, HSP90 acetylation level was not modified after HDAC6
5 inhibition in UT7/EPO cells. This may be related to (i) a different response of JAK2^{WT} and JAK2
6 V617F to HDACi⁵³ (ii) a different mechanism of JAK2 inhibition depending on the HDACi used.
7 Indeed, although HDAC6-mediated HSP90 acetylation level was thought to mediate JAK2 stability and
8 activity, a recent report identified HDAC11 as the main target to control the JAK-STAT pathway, cell
9 survival and proliferation in leukemic cells carrying the JAK2V617F mutation and in MPN induced in
10 mice by the MPL^{W515L} mutation⁵⁴. Since the decreased JAK2 response to EPO and the erythroid
11 differentiation delay observed after HDAC6 inhibition were independent of HSP90 hyperacetylation
12 and JAK2 degradation, it is likely that HDAC6 regulates JAK2 signaling and erythroid differentiation
13 through alternative pathways. We first assessed its cellular localization in erythroid cells. Indeed
14 HDAC6 carries a nuclear localization sequence (NLS) allowing its translocation to the nucleus where it
15 could impact histone acetylation level and control gene expression⁵⁵. In UT7/EPO and primary erythroid
16 cells, HDAC6 mainly localized in the cytoplasmic compartment and its inhibition did not significantly
17 modify histone H3 acetylation level. Therefore, HDAC6 role in human erythroid differentiation seems
18 mostly related to post-translational modifications by deacetylation of cytoplasmic substrates. We
19 identified 14-3-3 ζ as potentially hyperacetylated in primary human erythroid cells after ACY-1215
20 exposure, and this was confirmed using immunoblot. HDAC6 ability to deacetylate lysines in the
21 binding pocket of 14-3-3 ζ has already been described in HEK and MDA-MB-231 breast cell lines³⁴. 14-
22 3-3 proteins are a family of ubiquitous proteins lacking any intrinsic enzymatic property but able to
23 interact with partners phosphorylated on serine-threonine residues and thereby to modulate their activity
24 through distinct mechanisms such as modification of their conformational state, catalytic activity,
25 cellular distribution or stability^{56,57}. They have been involved through interactions with signaling
26 proteins in the control of cell proliferation, metabolism and survival. 14-3-3 proteins are frequently
27 overexpressed in different types of cancer and their knockdown sensitizes malignant cell lines to
28 apoptosis and inhibits cell growth^{58,59}. 14-3-3 is regulated by post-translational modifications, including
29 acetylation. In prostatic cancer cell line, 14-3-3 ζ hyperacetylation after HDAC6i leads to ERK and
30 CDC25 activation, blockage in cell cycle and apoptosis⁶⁰. 14-3-3 ζ is a crucial actor in hematopoiesis
31 through different mechanisms, dependent on cell lineage. In progenitors, it regulates signal transduction
32 downstream cytokine receptors such as GM-CSF or IL3⁶¹. During murine stress erythropoiesis, 14-3-3 ζ
33 inhibits FoxO3 nuclear translocation leading to a decreased expression of anti-oxidant genes⁶².
34 Moreover, upregulation of 14-3-3 ζ in mice following knock-out of its regulator miR-451 impaired
35 erythropoiesis through increased sensitivity to oxidative stress, and the induced defect in erythropoiesis
36 has been rescued upon 14-3-3 ζ knock-down⁶³. We hypothesized that 14-3-3 ζ was the main HDAC6i
37 target in human erythroid cells. Jiang et al. reported, in murine hematopoietic stem cells, a direct
38 interaction between LNK and 14-3-3 ζ alleviating the negative control of LNK on JAK2 signaling,
39 although the underlying mechanism was not described⁶⁴. The negative regulation of JAK2 activity by
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 LNK is crucial, as shown by faster development of MPN in *LNK*^{-/-} mice expressing a mutated JAK2,
4 and by the description of cases of MPN associated with LNK mutations in humans^{65,66}. Here, we show
5 that LNK availability to interact with JAK2 in erythroid cells is regulated by HDAC6-dependent 14-3-
6 3 ζ acetylation level. Indeed, ACY-1215 exposure led to a higher 14-3-3 ζ acetylation level, lowering its
7 interaction with LNK. In contrast, after HDAC6 inhibition, LNK interacts more strongly with JAK2,
8 leading to the repression of JAK2 signaling in response to EPO and inhibition of erythroid differentiation
9 (**Fig. 7**). Thus, in addition to its previously described role in the enucleation mice fetal liver erythroblasts
10 by deacetylation of mDia2²³, we identified here a new mechanism of HDAC6-dependent control of
11 human erythropoiesis through 14-3-3 ζ acetylation level, LNK availability and finally JAK2 activation
12 in response to EPO.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 **Acknowledgements**

25 Authors are grateful to the GIRCI Nord Ouest and the Société Française d'Hématologie for its financial
26 support. We are grateful to Dr Valerie DELAGUE et Catherine ROBERT from the Genomics and
27 Bioinformatics facility (GBiM) from the U 1251/Marseille Medical Genetics lab for their helpful
28 collaboration. We are grateful to Dr. Walaa Darwiche for her kind support in cell culture.
29
30
31

32 **Authorship Contributions**

33
34 PV, KM, NJ, YD, SD, CG, AC and JD performed research, PV, KM, HOH and TB analyzed data,
35
36 HOH, JPM, JR and LG designed the research, GJ performed sequencing analysis, PV, HOH and LG
37 wrote the paper.
38
39
40

41 **Disclosure of Conflicts of Interest**

42 Authors have no conflict of interest to disclose
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Legends to figures

Figure 1: HDAC6 is expressed during human erythroid differentiation and is localized in the cytoplasm of erythroid cells:

A: Scheme representing the *in vitro* differentiation protocol used in this study and the phenotype of erythroid cells at D6-D8 and D10 corresponding respectively to ACY-1215 exposure and phenotype analysis.

B: RQ-PCR showing *HDAC6* expression at different time points of *in vitro* erythroid differentiation of CD34⁺ cells from apheresis (n=3).

C: HDAC6 expression at protein level quantified by Western Blot analysis using the same differentiation assay (n=2).

D: HDAC6 localization in primary erythroid cells at D6, D8, D10 and D13 of *in vitro* differentiation using immunofluorescence (left, n=3) and flow imaging (right, n=1)

Figure 2: Consequences of HDAC6 chemical inhibition during *in vitro* human erythroid differentiation:

A: A representative immunoblot showing the acetylation level of Histone H3 (used as negative control since not an HDAC6 target) and α -tubulin (positive control, since a known cytoplasmic HDAC6 target) after HDAC6i exposure in human primary erythroid cells (n=3). GAPDH is the same internal control for both.

B: Comparative proliferation curves of human primary cells driven towards erythroid differentiation exposed to 0.5 μ M ACY-1215 or DMSO, n=3.

C: Increased apoptosis in D10 erythroid progenitors exposed to 0.5 μ M ACY-1215 in comparison with DMSO: % Annexin-V⁺ cells, DMSO vs. ACY: 3.33(\pm 1.5) vs. 14(\pm 5.3), n=3, p<0.05.

D: Decreased percentage of GPA^{High} cells at D10 of erythroid differentiation assessed by FCM after exposure to 0.5 μ M ACY-1215 vs. DMSO. Right: CD71/GPA dot plot obtained at D10 in one representative experiment. % of GPA^{High} cells at D10, DMSO vs. ACY: 38 (\pm 8.7) vs. 15 (\pm 7), n=3, p<.01.

E: Pictures of the red cell pellet obtained at D10 after DMSO and 0.5 μ M ACY-1215 exposure (one representative experiment, n=4)

F: Cytospin after May Grünwald Giemsa staining showing the D10 erythroblasts morphology after DMSO and 0.5 μ M exposure; immature cells are identified by *; left: image from one representative experiment; right: histograms showing the % of immature erythroblasts (ProE⁺ BasoE) in the two conditions: DMSO vs. ACY-1215: 39% (\pm 12.8) vs. 78.7% (\pm 11.6), n=4, p<.05.

Figure 3: global transcriptomic modulation induced by HDAC6 inhibition in primary cells

A: RQ-PCR showing the differential expression of 11 genes involved during erythroid differentiation between primary erythroid cells exposed to DMSO or ACY-1215. The figure represents the fold increase in the ACY-1215 conditions relative to DMSO, n=4.

B: *GATA2/GATA1* ratio at RNA level assessed by RQ-PCR in primary erythroid cells between the DMSO and the ACY-1215 conditions, n=4, p<.05.

C: GATA1 decrease at protein level assessed by Western blot in primary erythroid cells exposed to ACY-1215 comparatively to DMSO as a control, GATA1/GAPDH ratio, DMSO vs. ACY: 1.5 (±0.35) vs. 0.9 (±0.37), n=3, p<.05.

D: Heat map of Differentially Expressed Genes (DEG) in cells exposed to ACY-1215 or DMSO (control), n=3

E: Volcano plot of the 26897 identified genes (dots). Genes were considered DEG (red dots) with a Log₂ fold change threshold of 1 and an adjusted p-value threshold of 0,05 with 1170 upregulated and 786 downregulated.

F: Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of DEG showing enrichment for Bone Marrow Erythroblast (Normalized Enrichment Score (NES) = -7.322, False Discovery Rate (FDR)<.001, p<.001), Heme Metabolism (NES = -6.173, FDR<.001, p<.001), GATA1 Targets (NES = -3.238, FDR<.001, p<.001), E2F Targets (NES = -3.819, FDR <.001, p<.001), Cell Cycle (NES = -2.266, FDR<.01, p<.001).

Figure 4: Consequences of shRNA-mediated HDAC6 knockdown in the UT7/EPO erythroleukemic cell line

A: HDAC6 knockdown efficiency at RNA level assessed by RQ-PCR in UT7/EPO cells transduced with a lentivirus encoding a specific shRNA. Mean % of decrease relative to shSCR: 52% (±12), n=8, p<.0001.

B: HDAC6 knockdown efficiency at protein level assessed by Western blot in UT7/EPO cells. Mean % of decrease relative to shSCR: 45% (±9), n=4, p<.01. One representative experiment is shown on the right (n=4).

C: α -tubulin hyperacetylation in UT7/EPO cells transduced with the shHDAC6 lentiviral vector. One representative experiment is shown (n=3).

D: Annexin-V staining in UT7/EPO cells transduced with shSCR and shHDAC6. % of Annexin-V⁺ cells: 4.9% (±1.9) vs. 4.6% (±1.6), n=3, p=NS.

E: Decreased GPA expression at cell surface in UT7/EPO cells expressing a HDAC6 shRNA: percentage of GPA⁺ cells shSCR vs. shHDAC6: 64% (±3) vs. 29.7% (±2.3), n=3, p<.001. Histogram from one representative experiment is shown on the right.

F: Decreased GPA expression at RNA level in UT7/EPO cells expressing a HDAC6 shRNA, assessed by RQ-PCR: % decrease in shHDAC6 relative to shSCR: 51% (±23), n=6, p<.01.

Figure 5: HDAC6 knockdown and chemical inhibition in UT7/EPO cells and primary cells leads to decreased JAK2 and STAT5 phosphorylation in response to EPO

A: Left: p-JAK2/JAK2 ratio in UT7/EPO cells assessed by immunoblot after EPO stimulation between shSCR and shHDAC6-transduced cells: Mean ratio p-JAK2/JAK2: shSCR vs. shHDAC6: 1.11 (\pm 0.08) vs. 0.60 (\pm 0.16), n=5, p<.01. Right: one representative experiment is shown.

B: Right: p-JAK2/JAK2 ratio in UT7/EPO cells assessed by immunoblot after EPO stimulation in UT7/EPO cells exposed to DMSO or 0.5 μ M ACY-1215: Mean ratio p-JAK2/JAK2: DMSO vs. ACY: 0.79 (\pm 0.12) vs. 0.41 (\pm 0.19), n=6, p<.01. Left: one representative experiment is shown.

C: Left: p-STAT5/STAT5 ratio in UT7/EPO cells assessed by immunoblot after EPO stimulation in shSCR and shHDAC6-transduced cells; Mean ratio p-STAT5/STAT5 shSCR vs. shHDAC6: 1.5 (\pm 0.32) vs. 1.11 (\pm 0.26), n=4, p<.01. Right: one representative experiment is shown.

D: Right: p-STAT5/STAT5 ratio assessed by immunoblot after EPO stimulation in UT7/EPO cells exposed to DMSO or 0.5 μ M ACY-1215: Mean ratio p-STAT5/STAT5 DMSO vs. ACY: 0.84 (\pm 0.19) vs. 0.62 (\pm 0.17), n= 6, p<.01. Left: one representative experiment is shown.

E: Left: p-JAK2/JAK2 ratio after EPO stimulation in shSCR and shHDAC6-transduced UT7/EPO cells assessed by phosphoflow: Mean p-JAK2 MFI shSCR vs. shHDAC6: 3.5 \pm 0.9 vs. 1.3 \pm 0.3, n=3, p<.01.

F: Left: p-JAK2/JAK2 ratio after EPO stimulation in human primary erythroblasts cells exposed to DMSO or 0.5 μ M ACY-1215 assessed by phosphoflow: Mean p-JAK2 MFI DMSO vs. ACY: 5.2 \pm 1.1 vs. 2.2 \pm 0.3, n=3, p<.01, n=3. Right: histograms from one representative experiment: grey: isotype, blue: after EPO starvation, pink: after EPO restimulation.

Figure 6: HDAC6 inhibition in human primary erythroblasts leads to 14-3-3 ζ hyperacetylation, decreased LNK/14-3-3 ζ and increased JAK2/LNK interaction

A: 14-3-3 ζ acetylation level assessed after 14-3-3 immunoprecipitation and revelation using a anti-acetyl lysine antibody in human primary erythroblasts after DMSO or 0.5 μ M ACY-1215 exposure. Left: ratio acetyl/total 14-3-3 ζ : DMSO vs. ACY: 0.30 (\pm 0.146) vs. 0.82 (\pm 0.18), n= 3, p=.002. Right: one representative experiment is shown.

B: 14-3-3 ζ /LNK interaction assessed using 14-3-3 ζ immunoprecipitation and revelation using an anti-LNK antibody in human primary erythroblasts after DMSO or 0.5 μ M ACY-1215 exposure. Left: summary of 2 independent experiments, DMSO vs. ACY: 0.96 vs. 0.29. Right: One representative experiment is shown.

C: 14-3-3 ζ /LNK interaction assessed using LNK immunoprecipitation and revelation using an anti-14-3-3 ζ antibody in human primary erythroblasts after DMSO or 0.5 μ M ACY-1215 exposure. Left: ratio 14-3-3 ζ after IP/total 14-3-3 ζ : DMSO vs. ACY: 1.11 (\pm 0.19) vs. 0.45 (\pm 0.07), n= 3, p<.05. Right: one representative experiment is shown.

1
2
3 D: JAK2/LNK interaction assessed using LNK immunoprecipitation and revelation using an anti-JAK2
4 antibody in human primary erythroblasts after DMSO or 0.5 μ M ACY-1215 exposure. Left: ratio JAK2
5 after IP/total JAK2: DMSO vs. ACY: 0.28 (\pm 0.1) vs. 1.5(\pm 0.3), n= 3, p<.05. Right: one representative
6
7 experiment is shown.
8
9

10
11 **Figure 7: Scheme representing the effect of ACY-1215 on JAK2 signalling downstream EPO-R**
12 **activation**

13
14 A: Without ACY-1215, 14-3-3 ζ /LNK interactions release JAK2 from the negative control mediated by
15 LNK on its activation and signalization

16
17 B: In the presence of ACY-1215, hyperacetylation of 14-3-3 ζ blocks 14-3-3 ζ /LNK interaction,
18 increasing the LNK fraction that can interact with and inhibit JAK2.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

1. Karve TM, Cheema AK. Small Changes Huge Impact: The Role of Protein Posttranslational Modifications in Cellular Homeostasis and Disease. *Journal of Amino Acids*. 2011;2011:1-13. doi:10.4061/2011/207691
2. Arif M, Senapati P, Shandilya J, Kundu TK. Protein lysine acetylation in cellular function and its role in cancer manifestation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2010;1799(10-12):702-716. doi:10.1016/j.bbagr.2010.10.002
3. Yang XJ, Seto E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene*. 2007;26(37):5310-5318. doi:10.1038/sj.onc.1210599
4. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, et al. Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions. *Science*. 2009;325(5942):834-840. doi:10.1126/science.1175371
5. Yang XJ, Seto E. Lysine Acetylation: Codified Crosstalk with Other Posttranslational Modifications. *Molecular Cell*. 2008;31(4):449-461. doi:10.1016/j.molcel.2008.07.002
6. Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *IJMS*. 2017;18(7):1414. doi:10.3390/ijms18071414
7. Thomas S, Aggarwal R, Jahan T, et al. A phase I trial of panobinostat and epirubicin in solid tumors with a dose expansion in patients with sarcoma. *Annals of Oncology*. 2016;27(5):947-952. doi:10.1093/annonc/mdw044
8. Lyu X, Hu M, Peng J, Zhang X, Sanders YY. HDAC inhibitors as antifibrotic drugs in cardiac and pulmonary fibrosis. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. 2019;10:204062231986269. doi:10.1177/2040622319862697
9. Perla A, Fratini L, Cardoso PS, et al. Histone Deacetylase Inhibitors in Pediatric Brain Cancers: Biological Activities and Therapeutic Potential. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:546. doi:10.3389/fcell.2020.00546
10. Chen R, Zhang M, Zhou Y, et al. The application of histone deacetylases inhibitors in glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39(1):138. doi:10.1186/s13046-020-01643-6
11. Yee AJ, Raje NS. Panobinostat and Multiple Myeloma in 2018. *The Oncol*. 2018;23(5):516-517. doi:10.1634/theoncologist.2017-0644
12. Amengual JE, Lue JK, Ma H, et al. First-in-Class Selective HDAC6 Inhibitor (ACY-1215) Has a Highly Favorable Safety Profile in Patients with Relapsed and Refractory Lymphoma. *Oncologist*. 2021;26(3):184-e366. doi:10.1002/onco.13673
13. Vogl DT, Raje N, Hari P, et al. Phase 1B Results of Ricolinostat (ACY-1215) Combination Therapy with Bortezomib and Dexamethasone in Patients with Relapsed or Relapsed and Refractory Multiple Myeloma (MM). *Blood*. 2014;124(21):4764-4764. doi:10.1182/blood.V124.21.4764.4764
14. Lee EK, Tan-Wasielewski Z, Matulonis UA, et al. Results of an abbreviated Phase Ib study of the HDAC6 inhibitor ricolinostat and paclitaxel in recurrent ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer. *Gynecologic Oncology Reports*. 2019;29:118-122. doi:10.1016/j.gore.2019.07.010

15. Vogl DT, Raje N, Jagannath S, et al. Ricolinostat, the First Selective Histone Deacetylase 6 Inhibitor, in Combination with Bortezomib and Dexamethasone for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res.* 2017;23(13):3307-3315. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2526
16. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature.* 2002;417(6887):455-458. doi:10.1038/417455a
17. Kovacs JJ, Murphy PJM, Gaillard S, et al. HDAC6 Regulates Hsp90 Acetylation and Chaperone-Dependent Activation of Glucocorticoid Receptor. *Molecular Cell.* 2005;18(5):601-607. doi:10.1016/j.molcel.2005.04.021
18. Zhang X, Yuan Z, Zhang Y, et al. HDAC6 Modulates Cell Motility by Altering the Acetylation Level of Cortactin. *Molecular Cell.* 2007;27(2):197-213. doi:10.1016/j.molcel.2007.05.033
19. Vogl DT, Raje N, Jagannath S, et al. Ricolinostat, the First Selective Histone Deacetylase 6 Inhibitor, in Combination with Bortezomib and Dexamethasone for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res.* 2017;23(13):3307-3315. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2526
20. Niesvizky R, Richardson PG, Yee AJ, et al. Selective HDAC6 Inhibitor ACY-241, an Oral Tablet, Combined with Pomalidomide and Dexamethasone: Safety and Efficacy of Escalation and Expansion Cohorts in Patients with Relapsed or Relapsed-and-Refractory Multiple Myeloma (ACE-MM-200 Study). *Blood.* 2016;128(22):3307-3307. doi:10.1182/blood.V128.22.3307.3307
21. Gordon MS, Shapiro G, Sarantopoulos J, et al. A phase 1b study of the safety, pharmacokinetics, and preliminary antitumor activity of citarinostat (ACY-241) in combination with paclitaxel (Pac) in patients (pts) with advanced solid tumors (AST). *JCO.* 2018;36(15_suppl):2547-2547. doi:10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.2547
22. Messaoudi K, Ali A, Ishaq R, et al. Critical role of the HDAC6-cortactin axis in human megakaryocyte maturation leading to a proplatelet-formation defect. *Nat Commun.* 2017;8(1):1786. doi:10.1038/s41467-017-01690-2
23. Li X, Mei Y, Yan B, et al. Histone deacetylase 6 regulates cytokinesis and erythrocyte enucleation through deacetylation of formin protein mDia2. *Haematologica.* 2017;102(6):984-994. doi:10.3324/haematol.2016.161513
24. Ouled-Haddou H, Messaoudi K, Demont Y, et al. A new role of glutathione peroxidase 4 during human erythroblast enucleation. *Blood Adv.* 2020;4(22):5666-5680. doi:10.1182/bloodadvances.2020003100
25. Caulier A, Jankovsky N, Demont Y, et al. PIEZO1 activation delays erythroid differentiation of normal and hereditary xerocytosis-derived human progenitor cells. *Haematologica.* 2020;105(3):610-622. doi:10.3324/haematol.2019.218503
26. Wingett SW, Andrews S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Res.* 2018;7:1338. doi:10.12688/f1000research.15931.2
27. Tarasov A, Vilella AJ, Cuppen E, Nijman IJ, Prins P. Sambamba: fast processing of NGS alignment formats. *Bioinformatics.* 2015;31(12):2032-2034. doi:10.1093/bioinformatics/btv098
28. Pertea M, Pertea GM, Antonescu CM, Chang TC, Mendell JT, Salzberg SL. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat Biotechnol.* 2015;33(3):290-295. doi:10.1038/nbt.3122

- 1
- 2
- 3
- 4 29. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8
- 5
- 6 30. Gautier EF, Ducamp S, Leduc M, et al. Comprehensive Proteomic Analysis of Human Erythropoiesis. *Cell Rep.* 2016;16(5):1470-1484. doi:10.1016/j.celrep.2016.06.085
- 7
- 8 31. 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(7):1603-1611. doi:10.1084/jem.20062395
- 9
- 10 32. Lee JYC, Kuo CW, Tsai SL, et al. Inhibition of HDAC3- and HDAC6-Promoted Survivin Expression Plays an Important Role in SAHA-Induced Autophagy and Viability Reduction in Breast Cancer Cells. *Front Pharmacol.* 2016;7. doi:10.3389/fphar.2016.00081
- 11
- 12 33. Ghosh A, Garee G, Sweeny EA, Nakamura Y, Stuehr DJ. Hsp90 chaperones hemoglobin maturation in erythroid and nonerythroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115(6):E1117-E1126. doi:10.1073/pnas.1717993115
- 13
- 14 34. Mortenson JB, Heppler LN, Banks CJ, et al. Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Promotes the Pro-survival Activity of 14-3-3 ζ via Deacetylation of Lysines within the 14-3-3 ζ Binding Pocket. *Journal of Biological Chemistry.* 2015;290(20):12487-12496. doi:10.1074/jbc.M114.607580
- 15
- 16 35. Tong W, Zhang J, Lodish HF. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood.* 2005;105(12):4604-4612. doi:10.1182/blood-2004-10-4093
- 17
- 18 36. Li Y, Seto E. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(10):a026831. doi:10.1101/cshperspect.a026831
- 19
- 20 37. Yamamura K, Ohishi K, Katayama N, et al. Pleiotropic role of histone deacetylases in the regulation of human adult erythropoiesis. *Br J Haematol.* 2006;135(2):242-253. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06275.x
- 21
- 22 38. Huang S, Brandt SJ. mSin3A Regulates Murine Erythroleukemia Cell Differentiation through Association with the TAL1 (or SCL) Transcription Factor. *Mol Cell Biol.* 2000;20(6):2248-2259. doi:10.1128/MCB.20.6.2248-2259.2000
- 23
- 24 39. Kihara-Negishi F, Yamamoto H, Suzuki M, et al. In vivo complex formation of PU.1 with HDAC1 associated with PU.1-mediated transcriptional repression. *Oncogene.* 2001;20(42):6039-6047. doi:10.1038/sj.onc.1204756
- 25
- 26 40. Zhang W, Kadam S, Emerson BM, Bieker JJ. Site-Specific Acetylation by p300 or CREB Binding Protein Regulates Erythroid Krüppel-Like Factor Transcriptional Activity via Its Interaction with the SWI-SNF Complex. *Mol Cell Biol.* 2001;21(7):2413-2422. doi:10.1128/MCB.21.7.2413-2422.2001
- 27
- 28 41. Yang T, Jian W, Luo Y, et al. Acetylation of Histone Deacetylase 1 Regulates NuRD Corepressor Complex Activity. *Journal of Biological Chemistry.* 2012;287(48):40279-40291. doi:10.1074/jbc.M112.349704
- 29
- 30 42. Xu J, Bauer DE, Kerenyi MA, et al. Corepressor-dependent silencing of fetal hemoglobin expression by BCL11A. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2013;110(16):6518-6523. doi:10.1073/pnas.1303976110
- 31
- 32 43. Chen X, Bieker JJ. Stage-Specific Repression by the EKLF Transcriptional Activator. *Mol Cell Biol.* 2004;24(23):10416-10424. doi:10.1128/MCB.24.23.10416-10424.2004
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

- 1
2
3 44. Heideman MR, Lancini C, Proost N, Yanover E, Jacobs H, Dannenberg JH. Sin3a-associated Hdac1 and Hdac2 are essential for hematopoietic stem cell homeostasis and contribute differentially to hematopoiesis. *Haematologica*. 2014;99(8):1292-1303. doi:10.3324/haematol.2013.092643
- 7
8 45. Wilting RH, Yanover E, Heideman MR, et al. Overlapping functions of Hdac1 and Hdac2 in cell cycle regulation and haematopoiesis. *EMBO J*. 2010;29(15):2586-2597. doi:10.1038/emboj.2010.136
- 11
12 46. Ji P, Yeh V, Ramirez T, Murata-Hori M, Lodish HF. Histone deacetylase 2 is required for chromatin condensation and subsequent enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts. *Haematologica*. 2010;95(12):2013-2021. doi:10.3324/haematol.2010.029827
- 15
16 47. Watamoto K, Towatari M, Ozawa Y, et al. Altered interaction of HDAC5 with GATA-1 during MEL cell differentiation. *Oncogene*. 2003;22(57):9176-9184. doi:10.1038/sj.onc.1206902
- 19
20 48. Delehanty LL, Bullock GC, Goldfarb AN. Protein kinase D-HDAC5 signaling regulates erythropoiesis and contributes to erythropoietin cross-talk with GATA1. *Blood*. 2012;120(20):4219-4228. doi:10.1182/blood-2011-10-387050
- 23
24 49. Varricchio L, Dell'Aversana C, Nebbioso A, et al. Identification of NuRSERY, a new functional HDAC complex composed by HDAC5, GATA1, EKLf and pERK present in human erythroid cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2014;50:112-122. doi:10.1016/j.biocel.2014.02.019
- 28
29 50. Wang Y, Li W, Schulz VP, et al. Impairment of human terminal erythroid differentiation by histone deacetylase 5 deficiency. *Blood*. 2021;138(17):1615-1627. doi:10.1182/blood.2020007401
- 32
33 51. Ho N, Li A, Li S, Zhang H. Heat Shock Protein 90 and Role of Its Chemical Inhibitors in Treatment of Hematologic Malignancies. *Pharmaceuticals*. 2012;5(8):779-801. doi:10.3390/ph5080779
- 36
37 52. Bose P, Verstovsek S. Investigational histone deacetylase inhibitors (HDACi) in myeloproliferative neoplasms. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2016;25(12):1393-1403. doi:10.1080/13543784.2016.1250882
- 39
40 53. Guerini V, Barbui V, Spinelli O, et al. The histone deacetylase inhibitor ITF2357 selectively targets cells bearing mutated JAK2V617F. *Leukemia*. 2008;22(4):740-747. doi:10.1038/sj.leu.2405049
- 44
45 54. Yue L, Sharma V, Horvat NP, et al. HDAC11 deficiency disrupts oncogene-induced hematopoiesis in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2020;135(3):191-207. doi:10.1182/blood.2019895326
- 48
49 55. Liu Y, Peng L, Seto E, Huang S, Qiu Y. Modulation of Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Nuclear Import and Tubulin Deacetylase Activity through Acetylation. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(34):29168-29174. doi:10.1074/jbc.M112.371120
- 52
53 56. Pennington K, Chan T, Torres M, Andersen J. The dynamic and stress-adaptive signaling hub of 14-3-3: emerging mechanisms of regulation and context-dependent protein-protein interactions. *Oncogene*. 2018;37(42):5587-5604. doi:10.1038/s41388-018-0348-3
- 56
57 57. Yaffe MB. How do 14-3-3 proteins work? - Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Letters*. 2002;513(1):53-57. doi:10.1016/S0014-5793(01)03288-4
- 59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
58. Fan X, Cui L, Zeng Y, Song W, Gaur U, Yang M. 14-3-3 Proteins Are on the Crossroads of Cancer, Aging, and Age-Related Neurodegenerative Disease. *IJMS*. 2019;20(14):3518. doi:10.3390/ijms20143518
 59. Aghazadeh Y, Papadopoulos V. The role of the 14-3-3 protein family in health, disease, and drug development. *Drug Discovery Today*. 2016;21(2):278-287. doi:10.1016/j.drudis.2015.09.012
 60. Chuang MJ, Wu ST, Tang SH, et al. The HDAC Inhibitor LBH589 Induces ERK-Dependent Prometaphase Arrest in Prostate Cancer via HDAC6 Inactivation and Down-Regulation. Culig Z, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e73401. doi:10.1371/journal.pone.0073401
 61. Stomski FC, Dottore M, Winnall W, et al. Identification of a 14-3-3 binding sequence in the common beta chain of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interleukin-3 (IL-3), and IL-5 receptors that is serine-phosphorylated by GM-CSF. *Blood*. 1999;94(6):1933-1942.
 62. Yu D, dos Santos CO, Zhao G, et al. miR-451 protects against erythroid oxidant stress by repressing 14-3-3. *Genes & Development*. 2010;24(15):1620-1633. doi:10.1101/gad.1942110
 63. Patrick DM, Zhang CC, Tao Y, et al. Defective erythroid differentiation in miR-451 mutant mice mediated by 14-3-3. *Genes & Development*. 2010;24(15):1614-1619. doi:10.1101/gad.1942810
 64. Jiang J, Balcerek J, Rozenova K, et al. 14-3-3 regulates the LNK/JAK2 pathway in mouse hematopoietic stem and progenitor cells. *J Clin Invest*. 2012;122(6):2079-2091. doi:10.1172/JCI59719
 65. Gery S, Cao Q, Gueller S, Xing H, Tefferi A, Koeffler HP. Lnk inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2 mutant, JAK2V617F. *Journal of Leukocyte Biology*. 2009;85(6):957-965. doi:10.1189/jlb.0908575
 66. McMullin MF, Cario H. LNK mutations and myeloproliferative disorders: LNK and MPN. *Am J Hematol*. 2016;91(2):248-251. doi:10.1002/ajh.24259

Figure 1

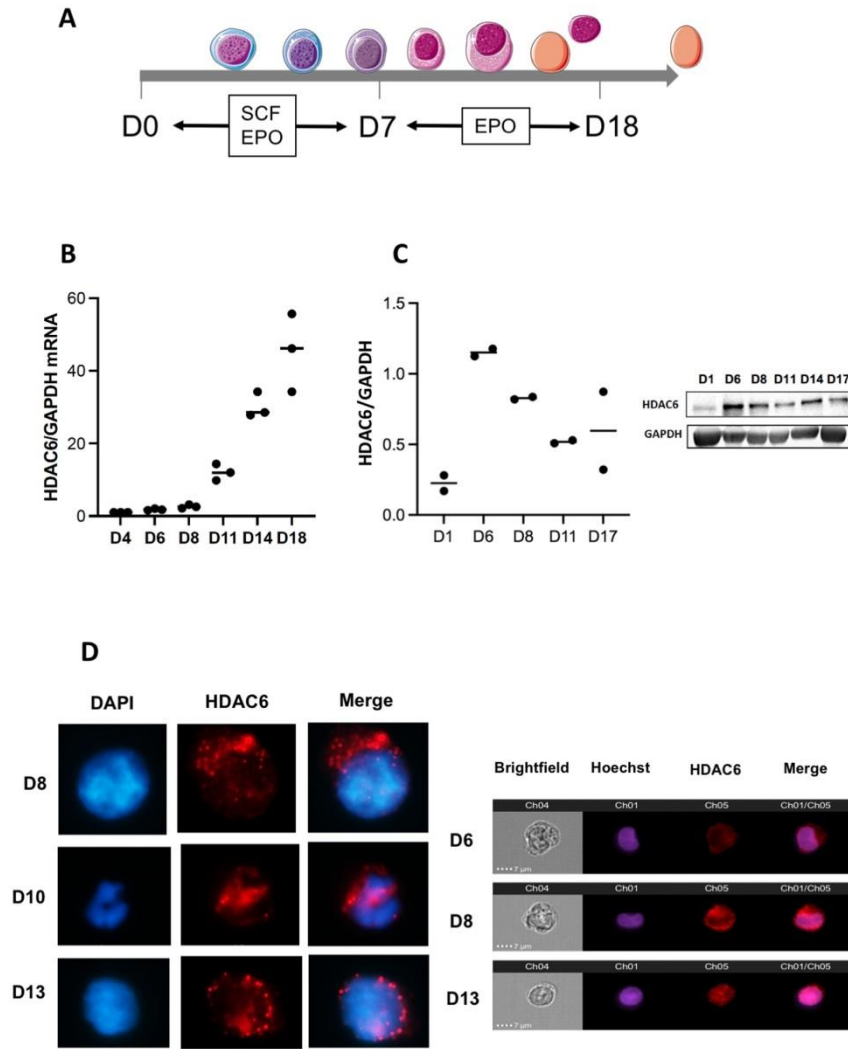


Figure 1

190x253mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 2

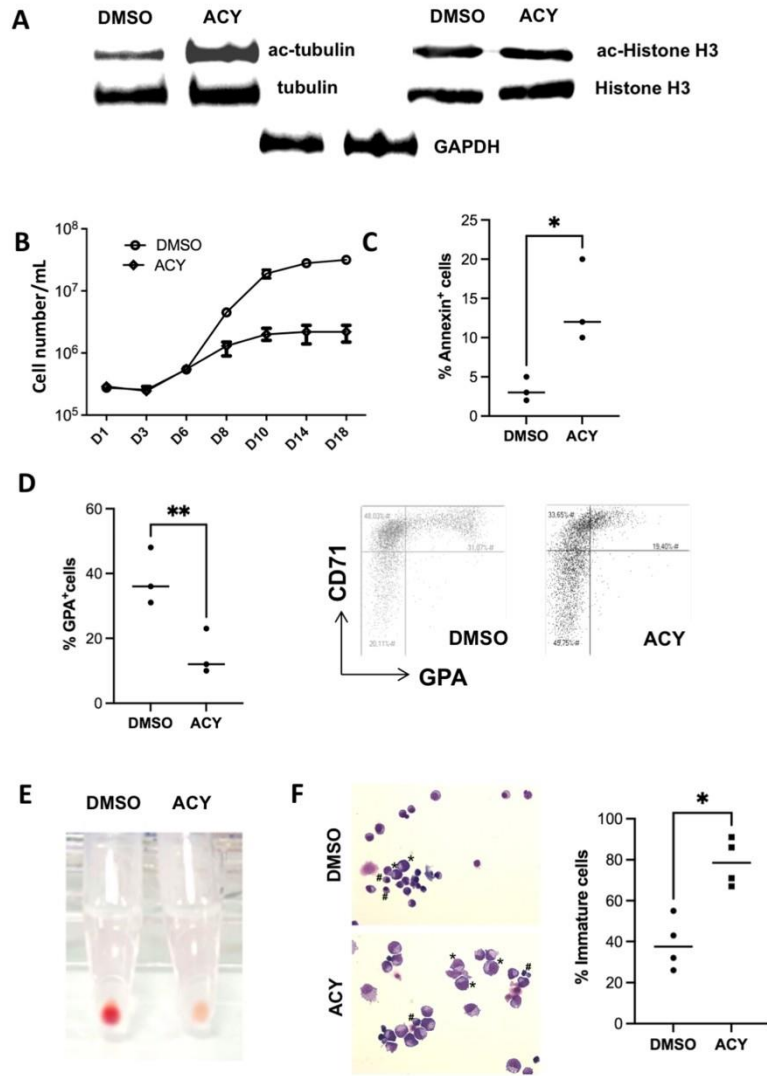


Figure 2

190x253mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 3

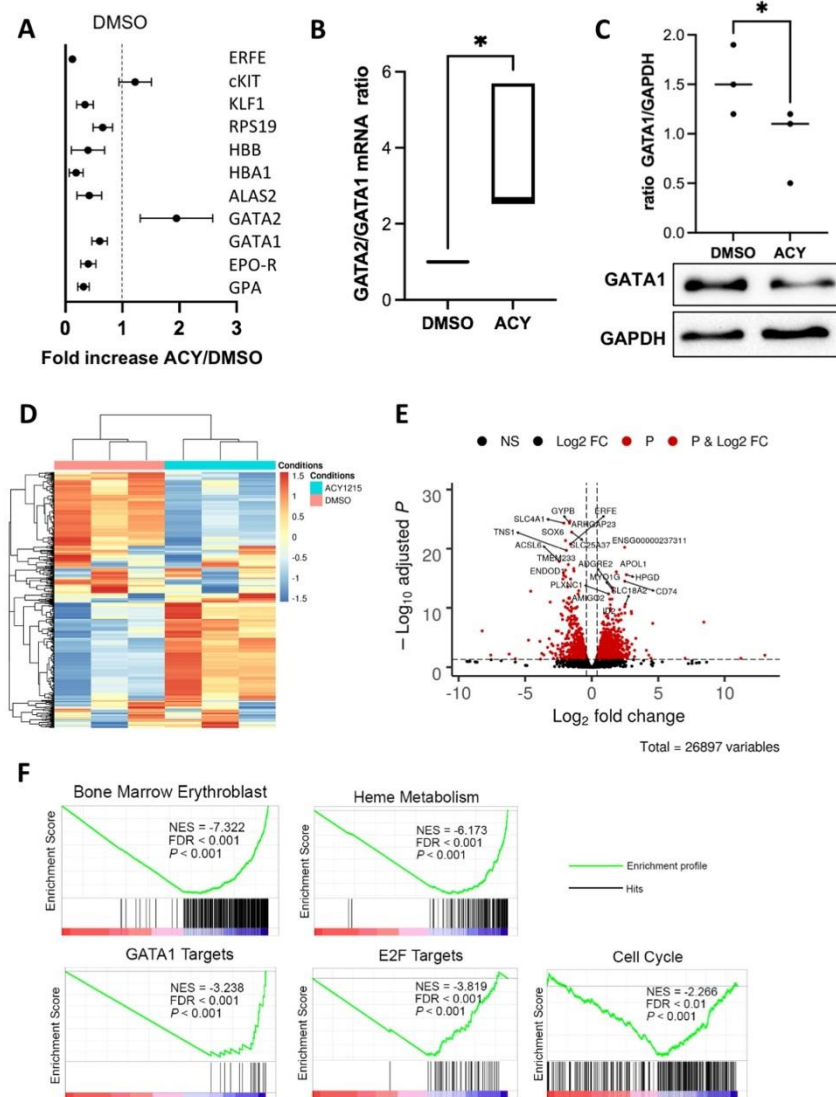


Figure 3

190x253mm (300 x 300 DPI)

Figure 4

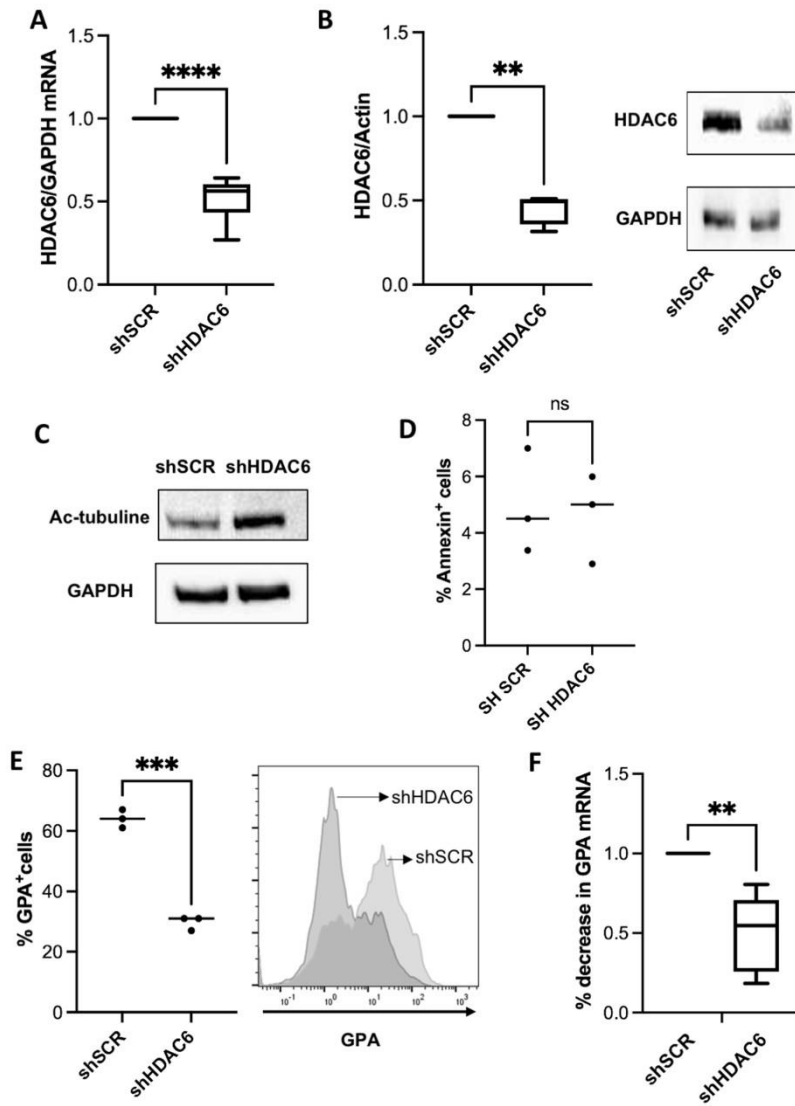


Figure 4

190x253mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 5

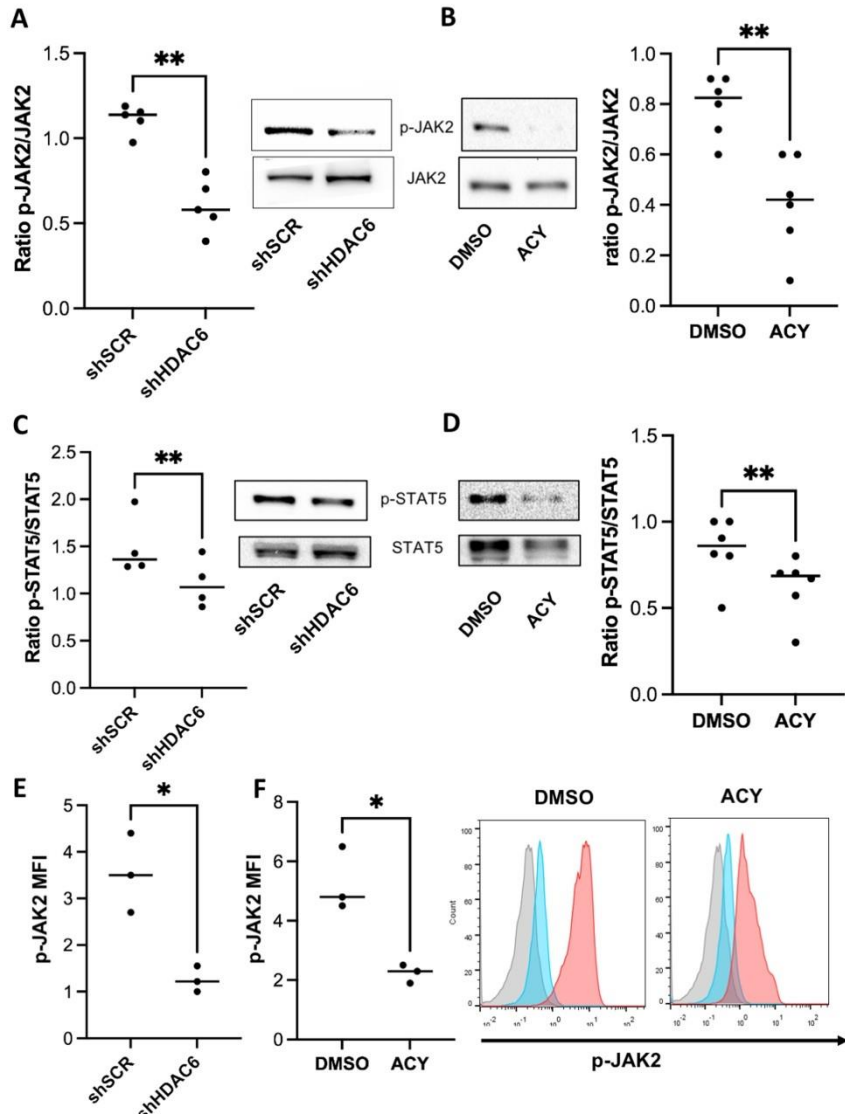


Figure 5

190x253mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 6

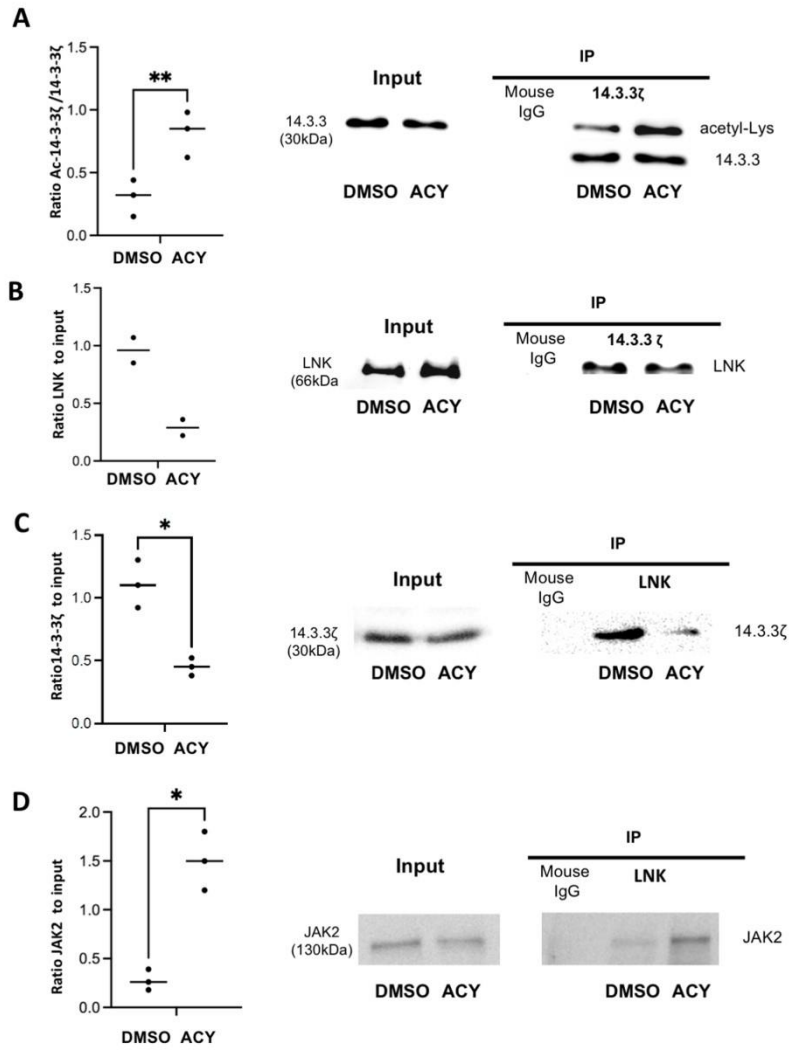


Figure 6

190x253mm (300 x 300 DPI)

Figure 7

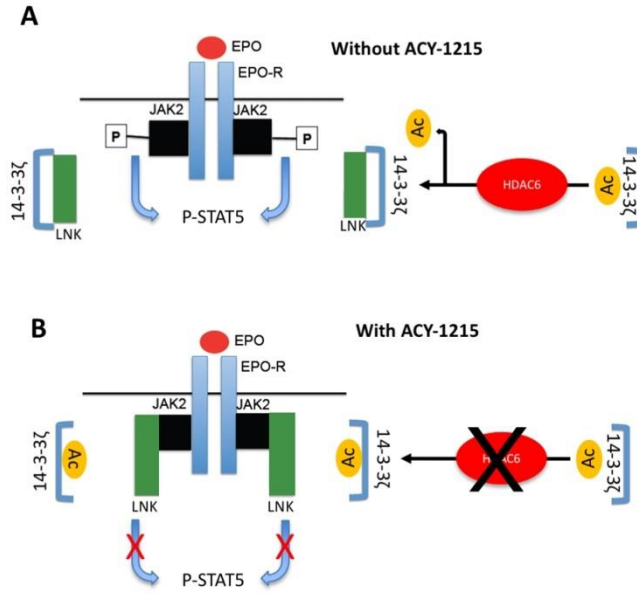


Figure 7

190x253mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Annexe III: Article 2

A new role of Glutathione Peroxidase 4 during human erythroblast enucleation

Running title: GPX4 role in human erythroblast enucleation

Ouled-Haddou Hakim¹, Messaoudi Kahia^{1,2}, Demont Yohann^{1,2}, Lopes-Dos-Santos Rogiero¹, Carola Candice^{1,3}, Caulier Alexis^{1,3}, Vong Pascal¹, Jankovsky Nicolas¹, Lebon Delphine^{1,3}, Willaume Alexandre¹, Demagny Julien^{1,2}, Boyer Thomas^{1,2}, Marolleau Jean Pierre^{1,3}, Rochette Jacques¹ and Garçon Loïc^{1,2,4}

1. Laboratoire HEMATIM EA4666, Université Picardie Jules Verne, Amiens, France
2. Service d'Hématologie Biologique, Centre Hospitalier Universitaire, Amiens, France
3. Service des Maladies du Sang, Centre Hospitalier Universitaire, Amiens, France
4. Service de Génétique Constitutionnelle, Centre Hospitalier Universitaire, Amiens, France

A new role of Glutathione Peroxidase 4 during human erythroblast enucleation

Tracking no: ADV-2020-003100R1-A

Hakim Ouled-Haddou (Université de Picardie Jules Verne, France) Kahia Messaoudi (CHU AMIENS UPJV, France) Yohann Demont (University Picardie Jules Verne, France) Rogerio Lopes Dos Santos (Université de Picardie Jules Verne, France) Candice Carola (University Picardie Jules Verne, France) Alexis Caulier (University Picardie Jules Verne, France) Pascal Vong (UPJV,) Nicolas Jankovsky (Université Picardie Jules Verne, France) Delphine Lebon (CHU Amiens, France) Alexandre Willaume (Université de Picardie Jules Verne, France) Julien Demagny (CHU Amiens-Picardie, France) Thomas Boyer (CHU Amiens, France) Jean-Pierre Marolleau (University Picardie Jules Verne, France) Jacques Rochette (Université de Picardie Jules Verne, France) Loïc Garçon (CHU Amiens, France)

Abstract:

The selenoprotein GPX4, the only member of the glutathione peroxidase family able to directly reduce at cell membrane oxidized fatty acids and cholesterol, was recently identified as the central regulator of ferroptosis. GPX4 knockdown in mice hematopoietic cells leads to hemolytic anemia and to increased death of spleen erythroid progenitors. Although expressed, the role of GPX4 during human erythropoiesis is unknown. Using an in vitro erythroid differentiation, we show here that GPX4 irreversible inhibition by RSL3 and its ShRNA-mediated knockdown strongly impaired enucleation in a ferroptosis-independent manner since not restored by tocopherol or iron chelators. During enucleation, GPX4 localized with lipid rafts at the cleavage furrow between reticulocytes and pyrenocytes. Its inhibition impacted enucleation after nuclear condensation and polarization and was associated with a defect in lipid raft clustering (Cholera Toxin staining) and Myosin regulatory light chain phosphorylation. Since selenoprotein translation and cholesterol synthesis share a common precursor, we investigated whether the enucleation defect could represent a compensatory mechanism favoring GPX4 synthesis at the expense of cholesterol, known to be abundant in lipid rafts. Lipidomics and filipin staining failed to show any quantitative difference in cholesterol content after RSL3 exposure. However, addition of cholesterol increased Cholera Toxin staining, Myosin regulatory light chain phosphorylation and improved enucleation despite GPX4 knockdown. In summary, we identified GPX4 as a new actor of human erythroid enucleation, independently of its function in ferroptosis control. We described its involvement in lipid raft organization required for contractile ring assembly and cytokinesis, leading in fine to nucleus extrusion.

Conflict of interest: No COI declared

COI notes:

Preprint server: No;

Author contributions and disclosures: HOH, KM, YD, RDS, CC, AC, PV, NJ, DL, AW and JD performed the experiments; HOH, KM, JR and LG designed the study and wrote the paper, TB and JPM provided intellectual input.

Non-author contributions and disclosures: No;

Agreement to Share Publication-Related Data and Data Sharing Statement: emails to the corresponding author

Clinical trial registration information (if any):

A new role of Glutathione Peroxidase4 during human erythroblast enucleation

Running title: GPX4 role in human erythroblast enucleation

Ouled-Haddou Hakim¹, Messaoudi Kahia^{1,2}, Demont Yohann^{1,2}, Lopes-Dos-Santos Rogiero¹, Carola Candice^{1,3}, Caulier Alexis^{1,3}, Vong Pascal¹, Jankovsky Nicolas¹, Lebon Delphine^{1,3}, Willaume Alexandre¹, Demagny Julien^{1,2}, Boyer Thomas^{1,2}, Marolleau Jean Pierre^{1,3}, Rochette Jacques¹ and Garçon Loïc^{1,2,4}

1. Laboratoire HEMATIM EA4666, Université Picardie Jules Verne, Amiens, France
2. Service d'Hématologie Biologique, Centre Hospitalier Universitaire, Amiens, France
3. Service des Maladies du Sang, Centre Hospitalier Universitaire, Amiens, France
4. Service de Génétique Constitutionnelle, Centre Hospitalier Universitaire, Amiens, France

Corresponding author: Loïc Garçon, EA4666 HEMATIM, CURS, Université Picardie Jules Verne, CHU Amiens, 80054 Amiens Cedex1Tel: 33 3 22 08 70 00, Fax 33 3 22 08 70 59, Email: Garcon.Loic@chu-amiens.fr

Key words: GPX4 – Ferroptosis - Human Erythropoiesis – Lipid raft - Enucleation

Word counts:

Abstract: 250

Main text: 3986

Figures: 7

Supplemental tables: 4

Supplemental figures: 8

Key Points :

- GPX4 is expressed during human erythropoiesis and is required for the enucleation of orthochromatic erythroblasts.
- GPX4 role in enucleation is independent from its function in ferroptosis regulation

ABSTRACT

The selenoprotein GPX4, the only member of the glutathione peroxidase family able to directly reduce at cell membrane oxidized fatty acids and cholesterol, was recently identified as the central regulator of ferroptosis. GPX4 knockdown in mice hematopoietic cells leads to hemolytic anemia and to increased death of spleen erythroid progenitors. Although expressed, the role of GPX4 during human erythropoiesis is unknown. Using an *in vitro* erythroid differentiation, we show here that GPX4 irreversible inhibition by RSL3 and its ShRNA-mediated knockdown strongly impaired enucleation in a ferroptosis-independent manner since not restored by tocopherol or iron chelators. During enucleation, GPX4 localized with lipid rafts at the cleavage furrow between reticulocytes and pyrenocytes. Its inhibition impacted enucleation after nuclear condensation and polarization and was associated with a defect in lipid raft clustering (Cholera Toxin staining) and Myosin regulatory light chain phosphorylation. Since selenoprotein translation and cholesterol synthesis share a common precursor, we investigated whether the enucleation defect could represent a compensatory mechanism favoring GPX4 synthesis at the expense of cholesterol, known to be abundant in lipid rafts. Lipidomics and filipin staining failed to show any quantitative difference in cholesterol content after RSL3 exposure. However, addition of cholesterol increased Cholera Toxin staining, Myosin regulatory light chain phosphorylation and improved enucleation despite GPX4 knockdown. In summary, we identified GPX4 as a new actor of human erythroid enucleation, independently of its function in ferroptosis control. We described its involvement in lipid raft organization required for contractile ring assembly and cytokinesis, leading *in fine* to nucleus extrusion.

INTRODUCTION

The glutathione peroxidase (GPX) enzymes are part of the protective system against oxidative damages that includes prevention of oxidation by iron-sequestering proteins and antioxidant molecules, scavengers of reactive oxygen species (ROS) and reduction of oxidants such as peroxides through enzymatic reactions. Experiments in mice revealed that the selenoprotein GPX4 was the only GPX family member essential for embryonic development.¹ It is also the sole GPX able to directly reduce at cell membrane cholesterol and polyunsaturated lipid peroxides into alcohols.² Recent reports identified GPX4 as the central inhibitor of ferroptosis, a process during which iron-induced peroxidation of membrane lipids causes a specific cell death that can be reverted by lipophilic antioxidants such as tocopherol or by iron chelators.³⁻⁵ Ferroptosis was first described in *ras*-mutated cancer cells and was induced directly by 1S,3R-RSL3 (RSL3), a pharmacological inhibitor targeting GPX4 by covalent bond or indirectly by erastin that depleted the GPX4 cofactor glutathione by blocking cystine import through transporter Xc⁻ inhibition.^{3,6} GPX4 has stimulated interest and is considered as a promising anticancer target.⁷ Many reports since highlighted implication of ferroptosis in multiple tissues and diseases including neurodegenerative diseases,⁸⁻¹² acute kidney injury,^{13,14} cardiomyopathy¹⁵ or recently hemochromatosis.¹⁶ Transferrin receptor I, highly expressed during erythropoiesis, was recently found upregulated in cancer cell lines treated with RSL3 and shown to be a specific ferroptosis marker.¹⁷ By potentially preventing from ferroptosis cells that contain high iron level required for heme synthesis, GPX4 appears as a good candidate for antioxidant defense in the erythroid lineage. The role of GPX4 in murine erythropoiesis has been recently revealed using a GPX4 knockout model restricted to hematopoietic cells. These mice developed anemia related to necroptotic death of erythroid precursors reverted *in vivo* by vitamin E and by Rip3 deletion.¹⁸ Late erythropoiesis was also impaired with defective reticulocyte maturation related to accumulation of large autophagosomes and impaired mitophagy.¹⁹ Although highly expressed at RNA level at orthochromatic stage,²⁰ GPX4 role during human erythroid maturation has not been reported so far. In this report, we aimed to study GPX4 expression and function during *in vitro* erythroid differentiation from human CD34⁺ cells obtained from apheresis. Using both an RSL3-mediated chemical inhibition and an shRNA-mediated GPX4 knockdown, we describe here for the first time a role of GPX4 in enucleation of human erythroblasts that is dependent on lipid raft clustering and Myosin phosphorylation.

METHODS

***In vitro* culture of human CD34⁺ progenitors**

CD34⁺ progenitor cells were isolated by positive selection kit (MiltenyiBiotec) using immunomagnetic beads cell-sorting system (AutoMacs; MiltenyiBiotec) from healthy leukapheresis samples, in agreement with our institutional ethics committee (Amiens Centre Hospitalo-Universitaire). From Day (D)1 to D6, sorted cells (purity>95%) were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) (Biochrom) supplemented with stabilized glutamine (Eurobio), containing 2% human AB serum (H2B), 100U/ml penicillin (Eurobio), 100µg/ml streptomycin (Eurobio), 500µg/ml human holo-transferrin (Sigma), 10µg/ml recombinant human insulin (Sigma), 2IU/ml heparin (Braun), 100ng/ml human stem cell factor (SCF) (MiltenyiBiotec) and 3IU/ml erythropoietin (EPO) (Roche). From D7 to D20, SCF was removed to the erythroid differentiation medium.

Clonogenic potential

Cultured cells were plated in triplicate at a density of 2000 cells in 1 ml of semisolid MethoCult H4435 enriched medium (Stem Cell Technologies) and incubated at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ after addition of DMSO or 1µM RSL3. The BFU-E (erythroid burst-forming units) and CFU-E (erythroid colony-forming units) colonies were cultured for 14 days according to the criteria described by Dover and al.²¹

Lentiviral particles production and cell transduction

Three ShRNA against *GPX4* and one scramble ShRNA cloned in pLKO.1-CMV-tGFP vector were purchased from Sigma Aldrich, designed using Mission® ShRNA tool (detailed sequences in **Suppl. Table 1**). Viral production and transduction were ensured as recently described.²²

Flow cytometry

Cells were harvested sequentially from D1 to D20 of differentiation, washed and stained with appropriate panels of conjugated antibodies in PBS plus 2mM EDTA and 0.5% BSA on ice (**Suppl. Table 2**). In all conditions, exclusion of non-viable cells was assessed using 7-amino-actinomycin D (7-AAD) or DAPI. AlexaFluor 647 Cholera Toxin subunit b (CTB) (Thermofisher) was used to stain lipid microdomains rich in ganglioside GM1. Lipid peroxidative damage was assessed by staining cells for 30 min with 10µM lipophilic fluorophore probe C11-BODIPY^{581/591} (Thermofisher) as previously described.²³ Filipin

(Sigma) was used at 0.1mg/ml to assess membrane cholesterol content after cell fixation using 1% PFA.²⁴

Fluorescent microscopy

Cells (5×10^4 /ml) treated with vehicle or RSL3 were fixed with 1% paraformaldehyde (PFA, Thermofisher), permeabilized (Permwash-BD), washed by centrifugation (1500 rpm, 5 minutes) resuspended in 100 μ l 1x PBS- 5%BSA then stained with AlexaFluor 647 GPX4 (SantaCruz) and AlexaFluor 488-conjugated Flotillin-2 (SantaCruz) or AlexaFluor 488-conjugated CTB (Thermofisher). After gentle washing followed by cytospin (300g, 5min), coverslip-attached erythroblasts were mounted onto glass plates using ProLong Gold Antifade Mountant with Dapi (Thermofisher). Images were taken using an Axio Imager M2 ApoTome microscope running ZEN software (Zeiss, France).

Reagents

RSL3, Simvastatin, Ferrostatin, Necrostatin were purchased from Selleckchem and alpha-tocophérol, Qvd-Oph, 3-MA, Deferoxamine, mercaptosuccinic acid, Cholesterol and Isopentenyl pyrophosphate were obtained from Sigma Aldrich.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using two-tailed p value and parametric tests. Statistical significance used was $\alpha=0.05$. For quantitative variables, we used Student's t-test or one-way ANOVA test and Tukey post-hoc analysis for multiparametric analysis. All numeric values as mean values \pm SEM.

Methods for imaging flow cytometry (IFC), immunoblots, RQ-PCR and neutral lipid quantification are detailed in "Supplemental Methods".

RESULTS

Following GPX4 inhibition effects throughout human erythroid differentiation

GPX4 expression at RNA and protein levels was first investigated during *ex vivo* erythropoiesis from human CD34⁺ cells. *GPX4* mRNA level was highly expressed from D6 to D11 compared to early progenitors (**Suppl. Fig 1A**), then decreased during terminal differentiation. At protein level, GPX4 expression was also highest from D6 to D11 then decreased from D14 to D17 during terminal stages when orthochromatic erythroblasts endured nucleus extrusion, in agreement with published proteomic data (**Suppl. Fig 1B**).²⁵ In attempt to verify if GPX4 expression correlated with a specific function during human erythropoiesis, we performed pharmacological inhibition throughout our differentiation model using RSL3 that binds specifically and covalently GPX4, resulting in its post-translational degradation.^{26–28} For *ex vivo* CD34⁺ cell differentiation, we tested three RSL3 concentrations: 0.5 μ M, 1 μ M and 2 μ M and measured, from D1 to D18, cell count and viability (data not shown). We chose 1 μ M RSL3 as the optimal dose with no lethality and an efficient GPX4 knockdown, in agreement with other reports.^{5,29} GPX4 protein level assessed by immunoblot decreased drastically after 1 μ M RSL3 exposure for 24h and 96h (**Suppl. Fig 1C and 1D**). In contrast, RSL3 did not affect GPX1 expression, another GPX family member expressed in the erythroid lineage (**Suppl. Fig 1C**). At 1 μ M, RSL3 added at D0 affected neither cell proliferation nor viability, highlighting a potential resistance of primary erythroblasts to ferroptosis driven by GPX4 inhibitor (**Fig 1A**). We then wondered whether the successive steps of erythroid differentiation could be affected by RSL3-mediated GPX4 inhibition. Progenitor compartment, assessed using erythroid colony-forming assay, was not impacted by RSL3 exposure (**Fig 1B**). We performed flow cytometry to follow erythroid maturation from hematopoietic progenitors to nucleated orthoerythroblasts (OrthoE) at D15. No significant changes in CD34, CD36, CD71, GPA, Band3 and CD49d expression were observed between RSL3-exposed cells and controls (**Fig 1C and Suppl. Fig 2A** for FCM strategy). We followed more precisely erythroid maturation assessing characteristics of late erythropoiesis, *i.e.* loss of CD49d assessed by FCM between D15 and D18, cell downsizing and decrease in nucleo-cytoplasmic ratio using imaging flow cytometry (IFC). We found no differences between DMSO and RSL3 conditions, only a trend towards an increased cell size but below threshold of significance (**Fig 1D, 1E and 1F**), arguing for a non-essential role of GPX4 from progenitor to orthochromatic stage.

Defective enucleation due to RSL3 or ShRNA-mediated GPX4 knockdown

We then studied the last step of erythroblast maturation, *i.e.* enucleation, which can be assimilated to an asymmetric cytokinesis leading to genesis from one erythroblast (GPA^{High},

Hoechst^{pos}) of one enucleated reticulocyte (GPA^{high}, Hoechst^{neg}) and one extruded nucleus *i.e* pyrenocyte (GPA^{low}, Hoechst^{pos}) (**Suppl. Fig 2A**).^{30,31,32} We cultured cells as described in Methods from D0, then added DMSO and RSL3 at D14 and followed carefully the enucleation process by FCM, cytology and IFC (D18-D20). In control cells, enucleation reached 75% at D20. In contrast, RSL3-exposed cells enucleated less efficiently, showing a 30% and a 50% reduction at D18 and D20 respectively in comparison with DMSO (**Fig 2A**). This enucleation defect was confirmed using cytology after MGG staining and IFC, showing with both techniques a higher proportion of nucleated erythroblasts after RSL3 exposure (**Fig 2B and Suppl. Fig 2B**). To verify that enucleation defect was not related to an off-target effect of RSL3, we performed GPX4 knockdown using three GPX4-specific shRNA sequences cloned into a lentiviral vector. After transduction, GFP⁺ erythroblasts were sorted and GPX4 expression quantified at RNA and protein levels. Using RQ-PCR, we observed a 65%, 25% and 63% decrease in GPX4 mRNA level in SH1, SH2 and SH3 transduced cells, respectively (**Suppl. Fig 3A**). Using Western Blot, SH1 and SH3 induced a 78% and 80% downregulation of GPX4 protein expression respectively, while SH2 was less efficient (59% decrease) (**Suppl. Fig 3B**). shRNA-mediated GPX4 knockdown didn't impact erythroid differentiation until enucleation (**Suppl. Fig 3C**). As for RSL3, percentage of Hoechst⁺ cells at D20 was significantly higher in GPX4-knockdown conditions than in controls and depended on the level of GPX4 knockdown (**Fig 2C**). Taken together, our data showed that enucleation was significantly impaired after GPX4 knockdown.

GPX4 inhibition impaired enucleation in a ferroptosis, mitophagy and necroptosis-independent manner

GPX4 is in many cell types a central regulator of ferroptosis.²⁷ However, level of lipid membrane peroxidation after GPX4 knockdown in primary erythroblasts, measured by C11-BODIPY^{581/591} staining, was low affecting less than 5% of erythroblasts after a 12h 1 μ M RSL3 exposure. Increasing RSL3 to 3 μ M impacted cell viability but weakly increased C11-BODIPY^{581/591} fluorescence (<10%) (**Fig 3A**). Erythroleukemic UT7 cells were also 10-fold more resistant to RSL3-induced lipid peroxidation than the myeloid cell line U937 and lymphoid cell line RAMOS (**Suppl. Fig 4A**). This weak C11-BODIPY^{581/591} staining argues for an enucleation defect being ferroptosis-independent. Indeed, (i) the indirect ferroptosis inducer erastin that acts upstream GPX4 didn't impact enucleation (**Suppl. Fig 4B**) and (ii) enucleation rate at D20 was not recovered by pre-treatment with ferroptosis inhibitors such as tocopherol, ferrostatin and deferoxamine (**Fig 3B**). We also investigated involvement of other cell death pathways: necroptosis (Necrox), apoptosis (QVD-Oph) or mitophagy (3-MA) inhibitors failed to revert GPX4 inhibition-related defect of enucleation (**Fig 3B**). We then assessed whether the relative resistance of primary erythroblasts to ferroptosis might be due

to compensatory mechanisms by other enzymes harboring a GPX activity such as peroxiredoxin-6 (PRDX6), the only enzyme of the PRDX family having both a phospholipase and a GPX activity.³³ PRDX6 expression is maximal at the end of erythroid maturation according to transcriptomic database.³⁴ We used mercaptosuccinic acid (MSA), a selective inhibitor of PRDX6 peroxidase activity.³⁵ We observed a synergistic effect of RSL3 and MSA, on the induction of membrane lipid peroxidation at D15 reflecting the fact that GPX4 and PRDX6 may compensate each other deficiency to protect human erythroblasts from lipid peroxidation (**Fig 3C**).

RSL3-induced enucleation defect was restored by cholesterol or its precursor IPP but was not directly related to decreased cholesterol content

Isopentenyl pyrophosphate (IPP), product of the mevalonate pathway, is an intermediate metabolite of cholesterol synthesis, and also a source of isopentenyl tRNA which is required for selenoprotein translation,^{36,37} highlighting the crosstalk between GPX4/ferroptosis and cholesterol pathways³⁸ (**Suppl. Fig 5A**). We wondered if RSL3 could favor the use of IPP towards isopentenyl-tRNA synthesis as a compensatory mechanism to GPX4 knockdown, at the expense of cholesterol production. Indeed cholesterol is essential for cytokinesis³⁹ and nucleus expulsion in mammalian erythropoiesis.^{40,41} Simvastatin, a specific inhibitor of HMG-CoA reductase, significantly decreased the enucleation rate, mimicking the effect of GPX4 knockdown (**Suppl. Fig 5B**). When 10 μ M cholesterol was added in the medium at D14, enucleation at D20 was partially restored in RSL3-treated erythroblasts as shown by FCM (**Fig 4A**) and cytology (**Fig 4B**). We quantified total cholesterol using filipin fluorescent probe⁴² and found no difference between control and RSL3-conditions at D20 (**Fig 4C**). We also performed neutral lipid extraction and quantification by analytic GC-FID chromatography and found no difference in the cholesterol/total neutral lipid ratio between the two conditions (**Fig 4D**). Notably, adding 5 μ M IPP at D14 in the medium partially restored enucleation at D20 (**Fig 4E**) but not GPX4 expression as assessed by Western Blot (**Fig 4F**). Taken together, our results evidenced that RSL3-mediated enucleation impairment was not related to a cholesterol quantitative defect by mevalonate pathway derivation. The recovery of the phenotype by an increased cholesterol uptake evoked however its involvement in the enucleation defect, but more likely in a qualitative way, through an anomaly of its repartition within cell membrane.

Enucleation impairment related to GPX4 knockdown occurs at the pyrenocyte-reticulocyte cytokinesis step

Enucleation is a well-coordinated multistep process that requires (i) chromatin condensation (ii) nucleus migration at cell surface on pole of the OrthoE (iii) contractile actin ring (CAR)

formation leading to cytokinesis. OrthoE nucleus compactness assessed by IFC was not impacted by RSL3 exposure (**Fig 5A**). A close examination of cytospin after MGG staining revealed that RSL3-treated cells presented a dense polar nucleus, revealing that nucleus migration was not impacted (**Fig 5B**). We confirmed this data using IFC^{43,44} by quantifying the “delta centroid” corresponding to the distance between the center of the nucleus mask (DAPI) and the center of the cytoplasmic mask (GPA).⁴⁵ RSL3-treated cells exhibited a delta centroid slightly higher than control erythroblasts (**Fig 5C**). By defining four gates corresponding to successive steps in nucleus extrusion (for mask strategy, *cf.* **Suppl Fig 6A and B**), we observed that RSL3 impacted enucleation lately during the separation between reticulocyte and pyrenocyte (**Fig 5D**). Since membrane lipid reorganization is known to play a central role in enucleation through clustering of lipid rafts at the cleavage furrow between pyrenocyte and reticulocyte,⁴⁶ we assessed GPX4 localization at D15 before enucleation using immunofluorescence and observed a perinuclear staining with polar reinforcement, evocating its potential role at this cleavage furrow (**Fig 6A**). Moreover, we observed that GPX4 co-localized with two lipid raft markers: Flotillin-2, a major protein component⁴⁷ (**Fig 6B**) and Cholera Toxin subunit b (CTB), a specific marker of GM1 ganglioside,⁴⁸ (**Fig 6C**) arguing for a GPX4 role in lipid raft clustering at cleavage furrow.

GPX4 knockdown-mediated enucleation defect is related to an impaired lipid raft clustering and CAR formation that can be restored by adding exogenous cholesterol

Clustering of lipid rafts containing GM1 gangliosides at the cleavage furrow is crucial for CAR formation between nascent reticulocyte and pyrenocyte border.⁴⁶ First, we studied CTB distribution using immunofluorescence microscopy and observed that, in control erythroblasts, CTB staining was strong and more intense around the nucleus, at the pole of nascent reticulocyte as previously reported.⁴⁶ In contrast, a diffuse and weak CTB signal was observed in RSL3-treated cells (**Fig 7A and Suppl. Fig 7**). This decreased CTB staining was confirmed using FCM (**Fig 7B**). These data supported that GPX4 inhibition strongly deemed to perturb lipid rafts integrity, resulting in impaired enucleation that may reflect a defect in CAR formation/function. Indeed, enucleation in mice requires CAR assembly and anchorage at the furrow, which depends on Myosin regulatory light chain (MRLC) phosphorylation.⁴⁶ We evaluated then whether GPX4 inhibition could affect MRLC phosphorylation. IFC revealed as expected pMRLC reinforcement at the cleavage furrow between reticulocyte and pyrenocyte (**Suppl. Fig 8A**). The staining was however strongly decreased in RSL3 condition, using western blot and FCM (**Fig 7C and 7D**), even if still predominant at the pyrenocyte/reticulocyte interface (**Suppl. Fig 8B**). At last, since cholesterol is required for lipid raft accumulation and stabilization during cytokinesis,⁴⁹ we hypothesized that the partial

reversion of the RSL3-induced enucleation defect observed after adding cholesterol in the medium (**Fig 4A**) was due to its ability to stabilize lipid rafts despite GPX4 knockdown. Indeed, we observed that adding cholesterol from D14 restored lipid raft formation as assessed by CTB staining at D20 (**Fig 7E**) and CAR assembly as assessed by pMRLC quantification using immunoblot at D18 (**Fig 7F**), in parallel with the restoration of enucleation in a context of GPX4 knockdown.

DISCUSSION

GPX4 was highly expressed in our culture system of human erythroid differentiation, reaching a peak at day D6 that corresponds to erythroblast exponential amplification associated to higher transferrin receptor expression and beginning of hemoglobin synthesis.^{50–52} Since erythroblasts require a high bioavailable iron concentration to synthesize hemoglobin, a seducing hypothesis would be that GPX4 would protect these cells with elevated cellular iron pool from ferroptosis. However, no significant impact of GPX4 inhibition in terms of cell death was observed during erythroblast differentiation. Moreover, lipid peroxide level was weakly increased in RSL3-treated primary erythroblasts. This is in contrast with mouse models, since *GPX4*^{-/-} mouse erythroblasts presented increased lipid peroxidation, ROS level and perturbed reticulocyte maturation.^{18,19} Such discrepancy between human and mice erythropoiesis has been described, notably when using knockout mice to model human diseases such as Diamond Blackfan anemia⁵³ or congenital dyserythropoietic anemia type II.⁵⁴ The relative resistance of human erythroblasts to ferroptosis and their ability to overcome the negative effects of GPX4 inhibition, if surprising, have been described in other cell models.^{29,55} Our findings showed that erythroblasts, for protecting themselves against ferroptosis, may rely on other enzymes with GPX activity that compensate each other deficiency. Our data identified PRDX6, expressed in erythroblasts³⁴ and recently identified as a regulator of ferroptosis,⁵⁶ as a potential candidate. Alternatively, other mechanisms of resistance could be also investigated, including ferroptosis suppressor protein1 (FSP1) as a lipid peroxy radical trap⁵⁷ or Prominin2-dependent multivesicular bodies formation and iron-containing exosomes release.⁵⁸

Enucleation is probably an evolutionary process that leaves more space for hemoglobin inside red cells and increases their deformability that is crucial for red cell survival in the red pulp of the spleen.⁵⁹ It is a complex process that requires reorganization of red cell lipid membrane and cytoplasmic cytoskeleton, leading to nucleus expulsion as well as asymmetric sorting of membrane proteins and lipids.^{31,60,61} Enucleation can be assimilated to an asymmetric cytokinesis^{62–64} with well-defined hallmarks: (i) a decrease in nucleus size and a chromatin condensation related to post transcriptional modifiers of gene expression,^{64–67} (ii) nuclear polarization,^{45,68} (iii) membrane lipid raft clustering,⁴⁶ (iv) formation of a contractile ring through a Rac-GTPase pathway^{69,70} and calcium-dependent activation of Calmodulin inducing Myosin II phosphorylation,⁷¹ (v) accumulation at the furrow of Clathrin-dependent vesicles that provide membrane material.^{72,73} Our main finding was that GPX4 knockdown altered human erythroblast enucleation *in vitro* during the steps (iii) and (iv), as shown by the arrest of nucleus extrusion after its polarization at cell surface. Interestingly, this phenotype was ferroptosis and necroptosis-independent although these cell deaths were

associated with GPX4 deficiency in mice erythroid cells.¹⁸ Instead, enucleation defect observed after GPX4 knockdown was associated with an alteration of lipid raft clustering. Lipid rafts are dynamic microdomains involved in membrane trafficking and signaling.^{74,75} Many reports highlighted their crucial role during cytokinesis,⁴⁹ a process to which enucleation can be compared.⁶² During cytokinesis, lipid rafts cluster at the cleavage furrow between the two daughter cells, allowing recruitment of small GTPases and progression of cytokinesis through a CAR formation. Konstantidinis et al confirmed using IFC that mouse erythroblast enucleation had the same requirement in terms of lipid raft confluence and CAR assembly.⁴⁶ Our results show that in human OrthoE, GPX4, the only GPX family member located at cell membrane localizes at the cleavage furrow with lipid raft markers and seems required for the re-organization of membrane lipid domains. Interestingly, enucleation defect could be partially restored by adding an excess of cholesterol. Exogenous cholesterol is known to integrate the outer leaflet of plasma membrane and concentrates during cytokinesis at the cleavage furrow, allowing sphingomyelin accumulation⁷⁷ and probably restoring lipid raft signaling.⁷⁸ Indeed, increasing the membrane cholesterol content could partially overcome GPX4 deficiency in RSL3-treated cells by increasing lipid raft markers and Myosin phosphorylation. However, the underlying mechanisms linking GPX4 to lipid rafts remain unclear. We first thought that GPX4 knockdown would induce a decrease in membrane cholesterol content by driving IPP towards selenocysteyl-tRNA synthesis and GPX4 translation at the expense of the cholesterol pathway. However, total cholesterol content was equivalent between DMSO and RSL3-treated cells. GPX4 knockdown may induce a qualitative defect with abnormal cholesterol distribution and destabilization of lipid rafts. High-resolution techniques that allow precise analysis of lipid distribution during enucleation process would be of great interest in that matter.

Finding a new protein involved in erythropoiesis raises the question of its potential implication in pathophysiology of hematological diseases and whether it could be used as a target for therapeutics. Ineffective erythropoiesis leading to anemia is observed in benign and malignant hemopathies such as thalassemia and myelodysplastic syndromes. In these diseases, erythroid defects leading to inaccurate reticulocyte production are heterogeneous and occur at multiple steps, including apoptosis of erythroid precursors, defective HSP70/GATA1 interaction, translation defect, aberrant splicing, oxidative stress and anomalies in terminal differentiation involving mitophagy and nuclear condensation.^{79–82} Enucleation is directly impaired during congenital dyserythropoietic anemia type (CDA) IV (OMIM #613673), a rare type of ineffective erythropoiesis leading to numerous circulating nucleated red cells. This autologous dominant disease is related to E325K mutation in KLF1, leading to expression of a variant with a strong dominant negative effect on KLF1 regulation network.^{83,84} *Ex vivo* culture of CD34⁺ cells from a CDA IV patient revealed no defect in

proliferation nor erythroid maturation until the orthoE stage but an alteration in enucleation reproducing the same phenotype observed after RSL3 exposure or GPX4 knockdown.⁸⁵ Defect in enucleation could then be related to a decreased GPX4 expression since (i) GPX4 enhancer/promoter region carries a KLF1 binding consensus site⁸⁶ (ii) GPX4 downregulation is observed in fetal liver cells of *KLF1*^{-/-} mice⁸⁷ and in polyE and orthoE of the E339D KLF1-mutant *Nan* mice.⁸⁸ Moreover, when studied *in vitro*, *EKLF*^{-/-} erythroid cells undergo normal nuclear condensation and polarization but are blocked at the last step of enucleation.^{89,90} Considering these data, it would be of great interest to study GPX4 expression, lipid raft clustering and CAR formation in erythroid cells from CDA IV patients to identify their potential involvement in the phenotype in addition to the already described cell cycle defect.⁸⁹

Deciphering human enucleation mechanisms is also a cornerstone for improving *ex vivo* red cell generation for transfusion purposes: protocols for large scale production of enucleated erythrocytes from CD34⁺ or peripheral mononuclear cells have been well described, with an up to 90% enucleation rate but are still donor-dependent.^{91,92} Attempts to use inexhaustible source of stem cells such as hES/iPS or immortalized cell lines are challenged by an insufficient enucleation rate obtained after driving these cells into erythroid differentiation.⁹³ Pathophysiological mechanisms leading to this defective enucleation remain not totally understood, despite recent data showing a persistent Vimentin expression having a negative effect on enucleation.⁹⁴ It has been shown that adding exogenous cholesterol improved the osmotic resistance of *ex vivo*-generated RBC from CD34⁺ cells. In this culture system with high enucleation efficiency, cholesterol supplementation could even increase the reticulocyte count and fasten erythroid maturation.⁹⁵ Therefore, previous data describing the importance of lipid rafts for CAR formation during enucleation, in addition to our results on involvement of GPX4 and cholesterol in this process, may represent a new way to study, understand and improve enucleation of erythroblasts obtained from these donor-independent stem cell sources.

In summary, our data identify GPX4 as a new actor in the vast family of proteins involved in human erythroblast enucleation. We could in this report specify the precise step during which it is involved, *i.e.* after nuclear condensation and polarization in OrthoE stage. We also demonstrated its involvement in lipid raft clustering and Myosin phosphorylation that are known to be essential for CAR assembly and cytokinesis between pyrenocytes and reticulocytes at the last step of erythroblast maturation.

Data Sharing Statement: Emails to the corresponding author, Loïc Garçon, Email: Garcon.Loic@chu-amiens.fr

FUNDING

This work has been funded by the RHEPI association and by the Club du Globule Rouge et du Fer (CGRF).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to University of Picardie-Jules Verne and to CHU Amiens Picardie for technical supports. The authors thank Dr Justine Bertrand-Michel and Aurélie Batut (MetaToul-Lipidomique Core Facility (I2MC, Inserm 1048, Toulouse, France), MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010) for lipidomic analysis, advices and technical support. We are grateful to Marie-Noelle Lacassagne, Christele Ossart and Aline Regnier (Cellular Therapy Laboratory of CHU Amiens) who provided human blood samples. We thank Pr. Lydie Da Costa for her scientific advices.

AUTHORSHIP AND CONFLICT OF INTEREST STATEMENTS

HOH, KM, YD, RDS, CC, AC, PV, AW, NJ, DL and JD performed the experiments; HOH, KM, JR and LG designed the study and wrote the paper, TB and JPM provided intellectual input. The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

FIGURES LEGENDS

Figure 1: Effects of GPX4 inhibition on human *in vitro* erythropoiesis from CD34⁺ cells to orthochromatic erythroblasts

A: Effect of GPX4 inhibitor, RSL3 at 1 μ M, vs. DMSO on cell counts from Day1 (D1) to D18 during *in vitro* erythroid differentiation from peripheral blood CD34⁺ cells. Dead cells were excluded using Trypan blue staining (n=3).

B. Effect of GPX4 inhibitor, RSL3 at 1 μ M, versus DMSO on clonogenic activity of erythroid progenitors. No differences in BFU-E and CFU-E counts were noticed (n=3).

C. Flow cytometry dot plots assessing erythroid differentiation at early D5 (CD34/CD36), intermediate D7 and D13 (CD71/GPA) and late D15 (CD49d/Band3) stages, in DMSO and 1 μ M RSL3 conditions. Dot plots were obtained from one representative experiment (n=3).

D, E, F. Comparative assessment of three features of orthochromatic erythroblast maturation between 1 μ M RSL3 and DMSO-treated cells: Mean fluorescence intensity of CD49d assessed by FCM showing its kinetics of decrease between D15 and D18 (n=3) (**D**), imaging flow cytometry analysis of cell size (**E**) and nucleo-cytoplasmic ratio (**F**), at D18-D20 (depending on the kinetics of differentiation) (n=5). None of these parameters were statistically different between DMSO and RSL3 conditions. A trend towards a higher cell size after RSL3 exposure was observed, but below significance threshold (p=.09).

Student's *t* test, **p* < .05; ***p* < .01; ****p* < .001. NS: non significant. Error bars are SEM

Figure 2: Enucleation impairment induced by GPX4 inhibition and gene silencing

A. Left: representative Band 3/Hoechst dot plots obtained at D20 in GPA⁺ control and 1 μ M RSL3-treated cells using FCM (n=5). Right: curves showing quantification of enucleated GPA⁺/Hoechst⁻ cells (%) from D16 to D20 in 1 μ M RSL3 and control treatments (n=5). Percent of enucleated cells DMSO vs. RSL3: D18: 49 \pm 4% vs. 31 \pm 3%, *p* < .01; D20: 78 \pm 5% vs. 39 \pm 5%, *p* < .01.

B. Left: May–Grunwald–Giemsa staining of DMSO or 1 μ M RSL3-treated cells. Images shown were taken at D18 and were representative of three independent experiments. Right: cytological count after MGG staining of orthochromatic erythroblasts and reticulocytes (%) in 1 μ M RSL3 and control conditions (n=3). Percent of RET, DMSO vs. RSL3: 43 \pm 6% vs. 10 \pm 3%, *p* < .01.

C. Left, histogram representing the percentage of decrease in D20 enucleation observed after transduction of three different ShRNA against GPX4 (SH1, SH2, SH3) in comparison to control (ShSCR) (n=3). Percent of enucleation decrease in comparison to SCR: SH1: 52 \pm 3%; SH2: 21 \pm 2%; SH3: 49 \pm 4%, SCR vs. each SH: *p* < .01. Right: a representative histogram of Hoechst staining at D20 in SCR and SH1-transduced cells.

p* < .05; *p* < .01; ****p* < .001. Error bars are SEM

Figure 3: Enucleation defect induced by GPX4 inhibition was not related to ferroptosis in human primary erythroblasts

A. FCM quantification of lipid ROS using C11-BODIPY^{581/591} staining in primary erythroblasts treated with RSL3 at two concentrations (1 μ M and 3 μ M) during 12h. H₂O₂ was used as positive control inducing a shift > 70% (not shown). RSL3 induced a dose-dependent, statistically significant but weak increase in percentage of positive cells (n=3). Percent of C11-BODIPY^{581/591+} cells, DMSO vs.1 μ M RSL3: 1 \pm 0.1% vs. 4 \pm 0.5%, p<.05. 1 μ M RSL3 vs. 3 μ M RSL3: 4 \pm 0.5% vs. 8 \pm 0.7%, p<.01.

B. Histogram showing quantification of enucleated GPA⁺/Hoechst⁻ cells (%) at D20 in DMSO and 1 μ M RSL3-treated cells, with and without ferroptosis inhibitors (100 μ M α -tocopherol, 2 μ M Ferrostatin, 5 μ M Deferoxamin), 20 μ M apoptosis inhibitor (QVD), 10 μ M necroptosis inhibitor (Necrox) and 5mM autophagy inhibitor (3MA). There was no statistically significant difference in the enucleation rate between DMSO and all the different inhibitors tested (n=3).

C. Induction of membrane lipid peroxidation assessed by FCM and C11-BODIPY^{581/591} staining after inhibition of GPX4 using 1 μ M RSL3 and inhibition of the GPX activity of PRDX6 using 40 μ M mercaptosuccinic acid (MSA) (n=3). DMSO vs. RSL3 and MSA, p<.05, RSL3 vs. MSA, p: NS, RSL3 or MSA vs. RSL3+MSA, p<.05.

*p<.05; **p<.01; ***p<.001. NS: non significant. Error bars are SEM

Figure 4: Mevalonate pathway's molecules partially reverted enucleation defect induced by GPX4 inhibition

A. FCM histogram showing quantification of enucleated D20 GPA⁺/Hoechst⁻ cells treated with DMSO or 1 μ M RSL3, with and without adding 10 μ M cholesterol (CHOL) at D14 in the culture medium (n=3). Percent of enucleated cells, RSL3 vs. RSL3 + CHOL: 35 \pm 1% vs. 50 \pm 1.6%, p<.01.

B. Left: D20 May–Grunwald–Giemsa staining of DMSO, 10 μ M CHOL, 1 μ M RSL3 and RSL3 + CHOL conditions. Right: MGG staining count of orthochromatic erythroblasts and reticulocytes (%) (n=3). Percent of RET RSL3 vs. RSL3+cholesterol: 26 \pm 4% vs. 46 \pm 6%, p<.05.

C. D20 cholesterol quantification in RSL3 and DMSO-treated cells using filipin staining on FCM after cell fixation. Left: filipin MFI DMSO vs.1 μ M RSL3: 11 \pm 0.9 vs. 9 \pm 0.2, n=3, p=NS. Right: a representative histogram of three independent experiments, methyl- β -cyclodextrin (MBCD) was used as a control of cholesterol depletion.

D. Left: histogram showing quantification of cholesterol/ total neutral lipids ratio measured by GC-FID method as described in Methods and normalized by protein quantity in D20 erythroblasts (n=3). Percent of CHOL/NL DMSO vs.1 μ M RSL3: 87.9 \pm 2.6% vs.88.2 \pm 2%, n=3, p=NS

E. Histogram showing FCM quantification of enucleated D20 GPA⁺/Hoechst⁻ cells treated with DMSO or 1μM RSL3, with and without 5μM isopentenyl pyrophosphate (IPP), at D20 (n=3). IPP partially restored the enucleation defect induced by RSL3. Percent of enucleated cells RSL3 vs. RSL3+IPP: 31 ±5% vs. 45 ±5%, p<.05.

F. Representative immunoblot from three independent experiments showing that the 1μM RSL3-related GPX4 knockdown at protein level was not reverted by 10μM cholesterol or 5μM IPP. Numbers represent mean GPX4/GAPDH ratio of each condition relative to DMSO (n=3).

*p<.05; **p<.01; ***p<.001. NS: non significant. Error bars are SEM

Figure 5: Enucleation impairment induced by GPX4 inhibition occurred after nucleus condensation and polarization

A. Imaging Flow Cytometry analysis of nuclear compactness in GPA⁺/Hoechst⁺ D18-D20 erythroblasts (performed when enucleation reached 50% in controls) treated with DMSO or 1μM RSL3 (n=5). To measure nuclear compactness, we used dedicated compactness feature from IDEAS(TM) software applied on the nuclear image channel 01 as identified by Hoechst staining. Briefly, it reveals the degree of how well the object is packed together, higher is the value, the more condensed is the object.

B. May Grunwald Giemsa staining showing nucleus polarization in DMSO and 1μM RSL3 conditions in D18-D20 erythroblasts (Arrow shows polar nucleus in orthochromatic erythroblasts; P: pyrenocytes, R: reticulocytes).

C. Left: Imaging Flow Cytometry measuring delta centroid in GPA⁺/Hoechst⁺ erythroblasts treated with DMSO or 1μM RSL3 (n=5). Delta centroid indicates eccentricity level of nucleus inside cell. Right: a representative IFC image showing OrthoE polarized nucleus in DMSO and 1μM RSL3 conditions. Delta centroid DMSO vs. RSL3: 0.93 ±0.03 vs. 0.99 ±0.05, p<.05.

E. Imaging Flow Cytometry analysis and quantification (%) of GPA⁺/Hoechst⁺ erythroblasts at different enucleation steps in DMSO or 1μM RSL3 conditions (n=5). Gates of the successive steps in nucleus polarization and extrusion are defined and detailed in supplementary figure 6. Briefly, Init corresponded to initiation of polarization with loss of the central position. Enuc 1 to 3 corresponds to progressive increase of the nucleus delta centroid associated with a decrease in the Aspect ratio Brightfield, Enuc 3 corresponding to extruding nuclei. Percent of Enuc2: DMSO vs. RSL3: 7.9 ±3% vs. 4.8 ±3.6%, p<.05; % Enuc 3: 1.2 ±0.6% vs. 0.4 ±0.2±: p<.05.

*p<.05; **p<.01; ***p<.001. NS: non significant. Error bars are SEM

Figure 6: GPX4 had a perinuclear distribution during enucleation and localized with lipid raft markers Flotillin and Cholera Toxin b subunit

A. Representative image of AlexaFluor 647-conjugated GPX4 immunolabelling and DAPI staining during erythroblast enucleation (n=3). These images were taken at D15 of differentiation at 60X magnification used with oil immersion

B, C Representative image of DAPI staining and (B) AlexaFluor 647-conjugated GPX4 and AlexaFluor 488-conjugated Flotillin-2 immunolabelling or (C) AlexaFluor 647-conjugated GPX4 and AlexaFluor 488-conjugated Cholera Toxin b immunolabelling on D15 at beginning of enucleation at 60X magnification used with oil immersion (n=3).

Figure 7: GPX4 inhibition led to disruption of lipid rafts at cleavage furrow and to decrease in Myosin phosphorylation that was partially restored by cholesterol

A. Representative image of DAPI, AlexaFluor 488-conjugated pMRLC, AlexaFluor 647-conjugated CTB staining using fluorescence microscopy in DMSO and 1 μ M RSL3 treated cells at D18 (n=3).

B. Histogram showing the significant decrease in CTB mean fluorescence intensity measured by FCM at D20 in 1 μ M RSL3-treated erythroblasts in comparison to DMSO (n=3). Mean MFI: 80 \pm 5 (DMSO) vs. 37 \pm 12 (RSL3), p<.05.

C. Left: representative phospho-Myosin Regulatory Light Chain immunoblot of erythroblasts treated with DMSO or 1 μ M RSL3 during enucleation stage at D18. Right: quantification of the decrease in pMRLC induced by 1 μ M RSL3 exposure, using the pMRLC/MRLC vs. GAPDH ratio (n=3): 0.69 \pm 0.05 vs. 0.34 \pm 0.06, p<.001.

D. Histogram showing mean fluorescence intensity of pMRLC, measured by FCM in fixed and permeabilized erythroblasts in DMSO and 1 μ M RSL3 conditions, during enucleation stage (n=3). p<.05.

E. Addition of 10 μ M cholesterol at D14 corrected the CTB decrease induced by RSL3 exposure, as assessed by FCM (n=3). D20 erythroblasts, CTB MFI RSL3 vs. RSL3+CHOL: 3.9 \pm 0.3 vs. 5.9 \pm 0.2, p<.05.

F. Left, representative phospho-Myosin Regulatory Light Chain and GPX4 immunoblot of erythroblasts treated with DMSO or 1 μ M RSL3, with and without 10 μ M cholesterol, during enucleation stage (n=3). Catalase, MRLC and GAPDH were used as load controls. Right: Densitometric pMRLC/MRLC vs. GAPDH ratio between RSL3 and RSL3+cholesterol from three independent experiments: 0.137 \pm 0.05 vs. 0.507 \pm 0.06, p<.001.

*p<.05; **p<.01; ***p<.001. Error bars are SEM

REFERENCES

1. Yant LJ, Ran Q, Rao L, et al. The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic. Biol. Med.* 2003;34(4):496–502.
2. Forcina GC, Dixon SJ. GPX4 at the Crossroads of Lipid Homeostasis and Ferroptosis. *PROTEOMICS.* 2019;19(18):1800311.
3. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell.* 2012;149(5):1060–1072.
4. Hirschhorn T, Stockwell BR. The development of the concept of ferroptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 2019;133:130–143.
5. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, et al. Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4. *Cell.* 2014;156(1–2):317–331.
6. Yang WS, Stockwell BR. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends Cell Biol.* 2016;26(3):165–176.
7. Manz DH, Blanchette NL, Paul BT, Torti FM, Torti SV. Iron and cancer: recent insights. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2016;1368(1):149–161.
8. Do Van B, Gouel F, Jonneaux A, et al. Ferroptosis, a newly characterized form of cell death in Parkinson's disease that is regulated by PKC. *Neurobiol. Dis.* 2016;94:169–178.
9. Tuo Q-Z, Lei P, Jackman KA, et al. Tau-mediated iron export prevents ferroptotic damage after ischemic stroke. *Mol. Psychiatry.* 2017;22(11):1520–1530.
10. Zhang Y-H, Wang D-W, Xu S-F, et al. α -Lipoic acid improves abnormal behavior by mitigation of oxidative stress, inflammation, ferroptosis, and tauopathy in P301S Tau transgenic mice. *Redox Biol.* 2018;14:535–548.
11. Ran Q, Gu M, Van Remmen H, et al. Glutathione peroxidase 4 protects cortical neurons from oxidative injury and amyloid toxicity. *J. Neurosci. Res.* 2006;84(1):202–208.
12. Li Q, Li Q-Q, Jia J-N, et al. Baicalein Exerts Neuroprotective Effects in FeCl₃-Induced Posttraumatic Epileptic Seizures via Suppressing Ferroptosis. *Front. Pharmacol.* 2019;10:638.
13. Friedmann Angeli JP, Schneider M, Proneth B, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat. Cell Biol.* 2014;16(12):1180–1191.
14. Skouta R, Dixon SJ, Wang J, et al. Ferrostatins inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models. *J. Am. Chem. Soc.* 2014;136(12):4551–4556.
15. Fang X, Wang H, Han D, et al. Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2019;116(7):2672–2680.
16. Wang H, An P, Xie E, et al. Characterization of ferroptosis in murine models of hemochromatosis. *Hepatology. Baltim. Md.* 2017;66(2):449–465.

17. Feng H, Schorpp K, Jin J, et al. Transferrin Receptor Is a Specific Ferroptosis Marker. *Cell Rep.* 2020;30(10):3411-3423.e7.
18. Canli Ö, Alankuş YB, Grootjans S, et al. Glutathione peroxidase 4 prevents necroptosis in mouse erythroid precursors. *Blood.* 2016;127(1):139–148.
19. Altamura S, Vegi NM, Hoppe PS, et al. Glutathione peroxidase 4 and vitamin E control reticulocyte maturation, stress erythropoiesis and iron homeostasis. *Haematologica.* 2020;105(4):937–950.
20. Li J, Hale J, Bhagia P, et al. Isolation and transcriptome analyses of human erythroid progenitors: BFU-E and CFU-E. *Blood.* 2014;124(24):3636–3645.
21. Dover GJ, Chan T, Sieber F. Fetal hemoglobin production in cultures of primitive and mature human erythroid progenitors: differentiation affects the quantity of fetal hemoglobin produced per fetal-hemoglobin-containing cell. *Blood.* 1983;61(6):1242–1246.
22. Caulier A, Jankovsky N, Demont Y, et al. PIEZO1 activation delays erythroid differentiation of normal and hereditary xerocytosis-derived human progenitor cells. *Haematologica.* 2020;105(3):610–622.
23. Sun Y, Zheng Y, Wang C, Liu Y. Glutathione depletion induces ferroptosis, autophagy, and premature cell senescence in retinal pigment epithelial cells. *Cell Death Dis.* 2018;9(7):1–15.
24. Muller CP, Stephany DA, Winkler DF, et al. Filipin as a flow microfluorometry probe for cellular cholesterol. *Cytometry.* 1984;5(1):42–54.
25. Gautier E-F, Ducamp S, Leduc M, et al. Comprehensive Proteomic Analysis of Human Erythropoiesis. *Cell Rep.* 2016;16(5):1470–1484.
26. Sui X, Zhang R, Liu S, et al. RSL3 Drives Ferroptosis Through GPX4 Inactivation and ROS Production in Colorectal Cancer. *Front. Pharmacol.* 2018;9:1371.
27. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell.* 2014;156(1–2):317–331.
28. Yang WS, Kim KJ, Gaschler MM, et al. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016;113(34):E4966-4975.
29. Tsoi J, Robert L, Paraiso K, et al. Multi-stage differentiation defines melanoma subtypes with differential vulnerability to drug-induced iron-dependent oxidative stress. *Cancer Cell.* 2018;33(5):890-904.e5.
30. Bell AJ, Satchwell TJ, Heesom KJ, et al. Protein distribution during human erythroblast enucleation in vitro. *PLoS One.* 2013;8(4):e60300.
31. Lee JC-M, Gimm JA, Lo AJ, et al. Mechanism of protein sorting during erythroblast enucleation: role of cytoskeletal connectivity. *Blood.* 2004;103(5):1912–1919.

32. An X, Chen L. Flow Cytometric Analysis of Erythroblast Enucleation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 2018;1698:193–203.
33. Fisher AB, Vasquez-Medina JP, Dodia C, et al. Peroxiredoxin 6 phospholipid hydroperoxidase activity in the repair of peroxidized cell membranes. *Redox Biol.* 2018;14:41–46.
34. Bagger FO, Sasivarevic D, Sohi SH, et al. BloodSpot: a database of gene expression profiles and transcriptional programs for healthy and malignant haematopoiesis. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(Database issue):D917–D924.
35. Chen JW, Dodia C, Feinstein SI, Jain MK, Fisher AB. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J. Biol. Chem.* 2000;275(37):28421–28427.
36. Kromer A, Moosmann B. Statin-induced liver injury involves cross-talk between cholesterol and selenoprotein biosynthetic pathways. *Mol. Pharmacol.* 2009;75(6):1421–1429.
37. Warner GJ, Berry MJ, Moustafa ME, et al. Inhibition of selenoprotein synthesis by selenocysteine tRNA[Ser]^{Sec} lacking isopentenyladenosine. *J. Biol. Chem.* 2000;275(36):28110–28119.
38. Friedmann Angeli JP, Conrad M. Selenium and GPX4, a vital symbiosis. *Free Radic. Biol. Med.* 2018;127:153–159.
39. Abe M, Kobayashi T. Dynamics of sphingomyelin- and cholesterol-enriched lipid domains during cytokinesis. *Methods Cell Biol.* 2017;137:15–24.
40. Fan J, Rone MB, Papadopoulos V. Translocator protein 2 is involved in cholesterol redistribution during erythropoiesis. *J. Biol. Chem.* 2009;284(44):30484–30497.
41. Kiatpakdee B, Sato K, Otsuka Y, et al. Cholesterol-binding protein TSPO2 coordinates maturation and proliferation of terminally differentiating erythroblasts. *J. Biol. Chem.* 2020;
42. Surls J, Nazarov-Stoica C, Kehl M, et al. Increased membrane cholesterol in lymphocytes diverts T-cells toward an inflammatory response. *PLoS One.* 2012;7(6):e38733.
43. Kalfa T, McGrath KE. Analysis of Erythropoiesis Using Imaging Flow Cytometry. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 2018;1698:175–192.
44. McGrath KE, Catherman SC, Palis J. Delineating stages of erythropoiesis using imaging flow cytometry. *Methods San Diego Calif.* 2017;112:68–74.
45. Thom CS, Traxler EA, Khandros E, et al. Trim58 degrades dynein and regulates terminal erythropoiesis. *Dev. Cell.* 2014;30(6):688–700.
46. Konstantinidis DG, Pushkaran S, Johnson JF, et al. Signaling and cytoskeletal requirements in erythroblast enucleation. *Blood.* 2012;119(25):6118–6127.
47. Salzer U, Prohaska R. Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. *Blood.* 2001;97(4):1141–1143.

48. Lauer S, Goldstein B, Nolan RL, Nolan JP. Analysis of cholera toxin-ganglioside interactions by flow cytometry. *Biochemistry*. 2002;41(6):1742–1751.
49. Ng MM, Chang F, Burgess DR. Movement of Membrane Domains and Requirement of Membrane Signaling Molecules for Cytokinesis. *Dev. Cell*. 2005;9(6):781–790.
50. Hu J, Liu J, Xue F, et al. Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. *Blood*. 2013;121(16):3246–3253.
51. Okumura N, Tsuji K, Nakahata T. Changes in cell surface antigen expressions during proliferation and differentiation of human erythroid progenitors. *Blood*. 1992;80(3):642–650.
52. Mello FV, Land MGP, Costa ES, et al. Maturation-associated gene expression profiles during normal human bone marrow erythropoiesis. *Cell Death Discov*. 2019;5(1):1–12.
53. McGowan KA, Mason PJ. Animal models of Diamond Blackfan anemia. *Semin. Hematol*. 2011;48(2):106–116.
54. Khoriaty R, Vasievich MP, Jones M, et al. Absence of a red blood cell phenotype in mice with hematopoietic deficiency of SEC23B. *Mol. Cell. Biol*. 2014;34(19):3721–3734.
55. Zou Y, Palte MJ, Deik AA, et al. A GPX4-dependent cancer cell state underlies the clear-cell morphology and confers sensitivity to ferroptosis. *Nat. Commun*. 2019;10(1):1617.
56. Lu B, Chen X-B, Hong Y-C, et al. Identification of PRDX6 as a regulator of ferroptosis. *Acta Pharmacol. Sin*. 2019;40(10):1334–1342.
57. Doll S, Freitas FP, Shah R, et al. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature*. 2019;575(7784):693–698.
58. Brown CW, Amante JJ, Chhoy P, et al. Prominin2 Drives Ferroptosis Resistance by Stimulating Iron Export. *Dev. Cell*. 2019;51(5):575–586.e4.
59. Snyder GK, Sheafor BA. Red Blood Cells: Centerpiece in the Evolution of the Vertebrate Circulatory System. *Integr. Comp. Biol*. 1999;39(2):189–198.
60. Wickrema A, Koury ST, Dai CH, Krantz SB. Changes in cytoskeletal proteins and their mRNAs during maturation of human erythroid progenitor cells. *J. Cell. Physiol*. 1994;160(3):417–426.
61. Yoshida H, Kawane K, Koike M, et al. Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature*. 2005;437(7059):754–758.
62. Chasis JA, Prenant M, Leung A, Mohandas N. Membrane assembly and remodeling during reticulocyte maturation. *Blood*. 1989;74(3):1112–1120.
63. Skutelsky E, Danon D. Comparative study of nuclear expulsion from the late erythroblast and cytokinesis. *Exp. Cell Res*. 1970;60(3):427–436.
64. Swartz KL, Wood SN, Murthy T, et al. E2F-2 Promotes Nuclear Condensation and Enucleation of Terminally Differentiated Erythroblasts. *Mol. Cell. Biol*. 2017;37(1):.

65. Ji P, Yeh V, Ramirez T, Murata-Hori M, Lodish HF. Histone deacetylase 2 is required for chromatin condensation and subsequent enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts. *Haematologica*. 2010;95(12):2013–2021.
66. Popova EY, Krauss SW, Short SA, et al. Chromatin condensation in terminally differentiating mouse erythroblasts does not involve special architectural proteins but depends on histone deacetylation. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* 2009;17(1):47–64.
67. Zhang L, Flygare J, Wong P, Lim B, Lodish HF. miR-191 regulates mouse erythroblast enucleation by down-regulating Riok3 and Mxi1. *Genes Dev.* 2011;25(2):119–124.
68. Skutelsky E, Danon D. An electron microscopic study of nuclear elimination from the late erythroblast. *J. Cell Biol.* 1967;33(3):625–635.
69. Ji P, Jayapal SR, Lodish HF. Enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts requires Rac GTPases and mDia2. *Nat. Cell Biol.* 2008;10(3):314–321.
70. Kalfa TA, Zheng Y. Rho GTPases in Erythroid Maturation. *Curr. Opin. Hematol.* 2014;21(3):165–171.
71. Wölwer CB, Pase LB, Russell SM, Humbert PO. Calcium Signaling Is Required for Erythroid Enucleation. *PloS One*. 2016;11(1):e0146201.
72. Keerthivasan G, Small S, Liu H, Wickrema A, Crispino JD. Vesicle trafficking plays a novel role in erythroblast enucleation. *Blood*. 2010;116(17):3331–3340.
73. Koury ST, Koury MJ, Bondurant MC. Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts. *J. Cell Biol.* 1989;109(6 Pt 1):3005–3013.
74. Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*. 2010;327(5961):46–50.
75. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 1997;387(6633):569–572.
76. Konstantinidis DG, Pushkaran S, Johnson JF, et al. Signaling and cytoskeletal requirements in erythroblast enucleation. *Blood*. 2012;119(25):6118–6127.
77. Abe M, Makino A, Hullin-Matsuda F, et al. A Role for Sphingomyelin-Rich Lipid Domains in the Accumulation of Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate to the Cleavage Furrow during Cytokinesis. *Mol. Cell. Biol.* 2012;32(8):1396–1407.
78. Ratajczak MZ, Adamiak M. Membrane lipid rafts, master regulators of hematopoietic stem cell retention in bone marrow and their trafficking. *Leukemia*. 2015;29(7):1452–1457.
79. Rivella S. Ineffective erythropoiesis and thalassemias. *Curr. Opin. Hematol.* 2009;16(3):187–194.
80. Lefèvre C, Bondu S, Le Goff S, Kosmider O, Fontenay M. Dyserythropoiesis of myelodysplastic syndromes. *Curr. Opin. Hematol.* 2017;24(3):191–197.

81. Aleshin A, Greenberg PL. Molecular pathophysiology of the myelodysplastic syndromes: insights for targeted therapy. *Blood Adv.* 2018;2(20):2787–2797.
82. Zhao B, Liu H, Mei Y, et al. Disruption of erythroid nuclear opening and histone release in myelodysplastic syndromes. *Cancer Med.* 2019;8(3):1169–1174.
83. Gillinder KR, Ilsley MD, Nébor D, et al. Promiscuous DNA-binding of a mutant zinc finger protein corrupts the transcriptome and diminishes cell viability. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(3):1130–1143.
84. Ilsley MD, Huang S, Magor GW, et al. Corrupted DNA-binding specificity and ectopic transcription underpin dominant neomorphic mutations in KLF/SP transcription factors. *BMC Genomics.* 2019;20(1):417.
85. Arnaud L, Saison C, Helias V, et al. A dominant mutation in the gene encoding the erythroid transcription factor KLF1 causes a congenital dyserythropoietic anemia. *Am. J. Hum. Genet.* 2010;87(5):721–727.
86. Fishilevich S, Nudel R, Rappaport N, et al. GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards. *Database J. Biol. Databases Curation.* 2017;2017:.
87. Drissen R, von Lindern M, Kolbus A, et al. The erythroid phenotype of EKLF-null mice: defects in hemoglobin metabolism and membrane stability. *Mol. Cell. Biol.* 2005;25(12):5205–5214.
88. Nébor D, Graber JH, Ciciotte SL, et al. Mutant KLF1 in Adult Anemic Nan Mice Leads to Profound Transcriptome Changes and Disordered Erythropoiesis. *Sci. Rep.* 2018;8(1):12793.
89. Gnanapragasam MN, McGrath KE, Catherman S, et al. EKLF/KLF1-regulated cell cycle exit is essential for erythroblast enucleation. *Blood.* 2016;128(12):1631–1641.
90. Cantú I, van de Werken HJG, Gillemans N, et al. The mouse KLF1 Nan variant impairs nuclear condensation and erythroid maturation. *PLoS One.* 2019;14(3):e0208659.
91. Giarratana M-C, Rouard H, Dumont A, et al. Proof of principle for transfusion of in vitro-generated red blood cells. *Blood.* 2011;118(19):5071–5079.
92. Heshusius S, Heideveld E, Burger P, et al. Large-scale in vitro production of red blood cells from human peripheral blood mononuclear cells. *Blood Adv.* 2019;3(21):3337–3350.
93. Sun S, Peng Y, Liu J. Research advances in erythrocyte regeneration sources and methods in vitro. *Cell Regen. Lond. Engl.* 2018;7(2):45–49.
94. Trakarnsanga K, Ferguson D, Daniels DE, et al. Vimentin expression is retained in erythroid cells differentiated from human iPSC and ESC and indicates dysregulation in these cells early in differentiation. *Stem Cell Res. Ther.* 2019;10(1):130.
95. Bernecker C, Köfeler H, Pabst G, et al. Cholesterol Deficiency Causes Impaired Osmotic Stability of Cultured Red Blood Cells. *Front. Physiol.* 2019;10:1529.

Figure 1

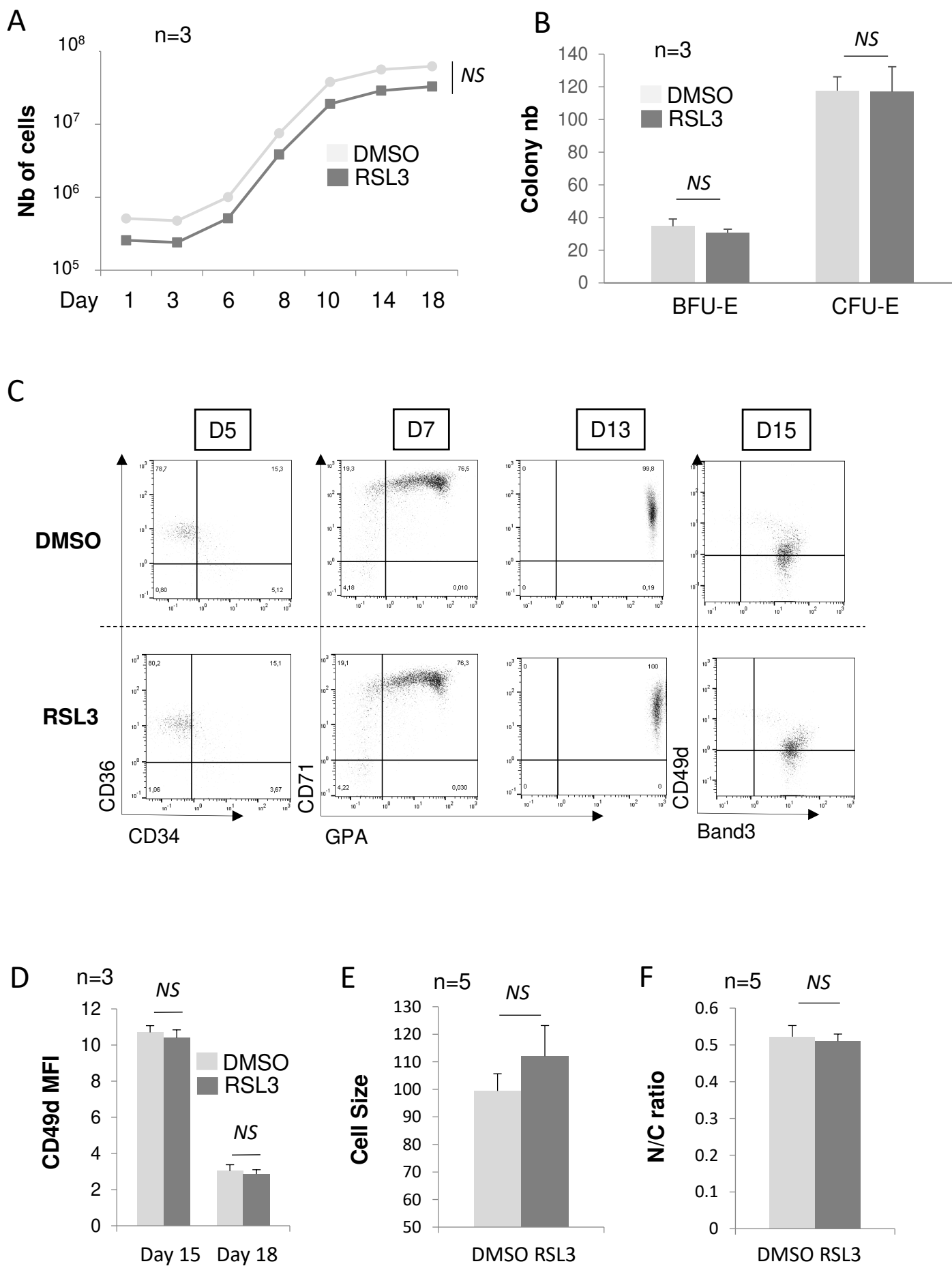
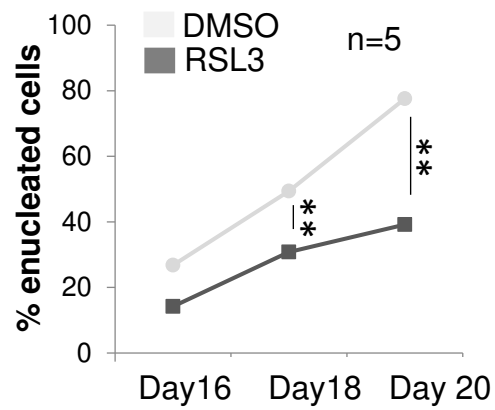
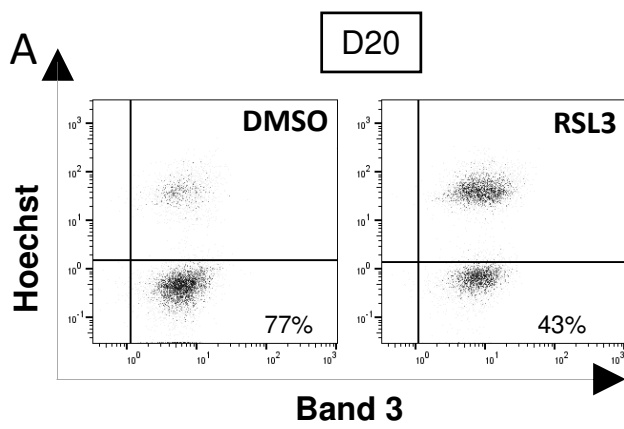
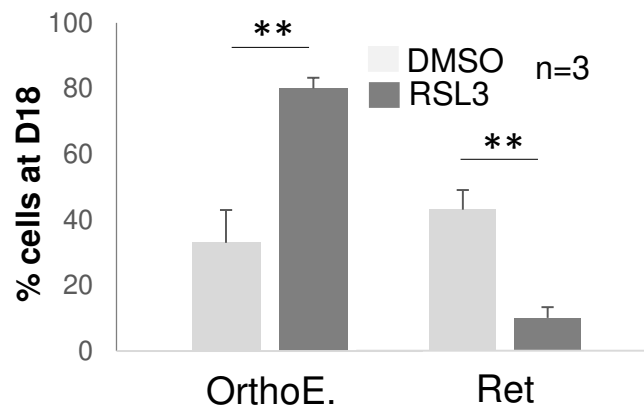
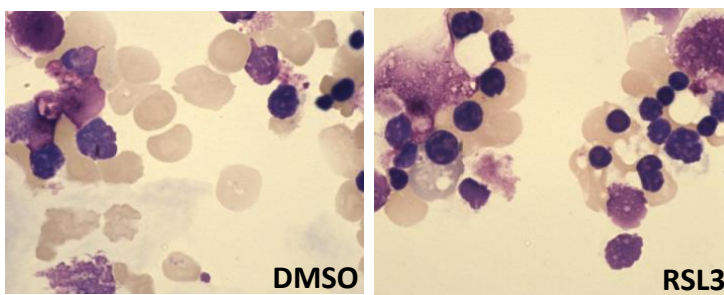


Figure 2



B



C

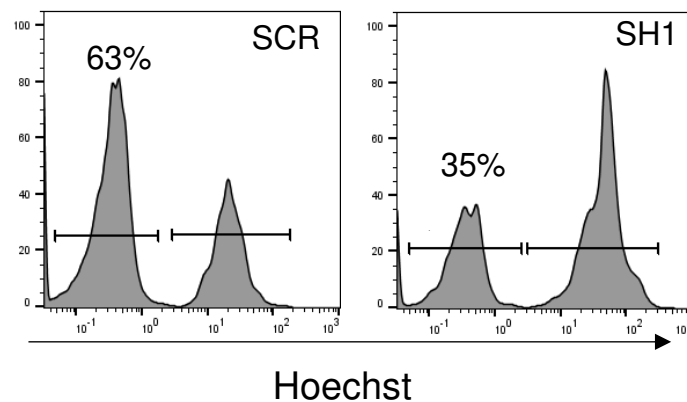
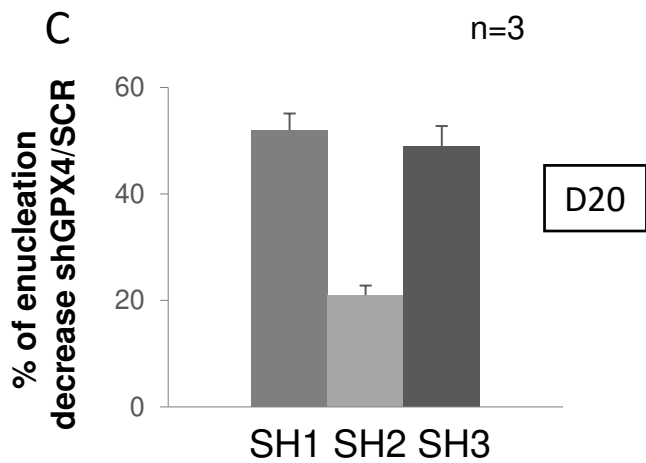
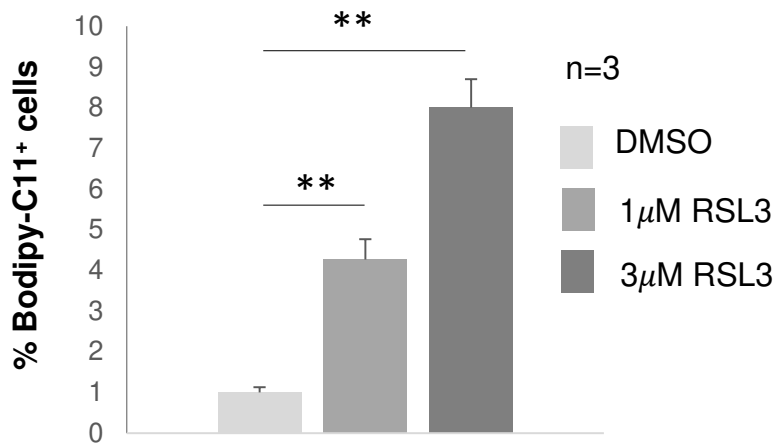
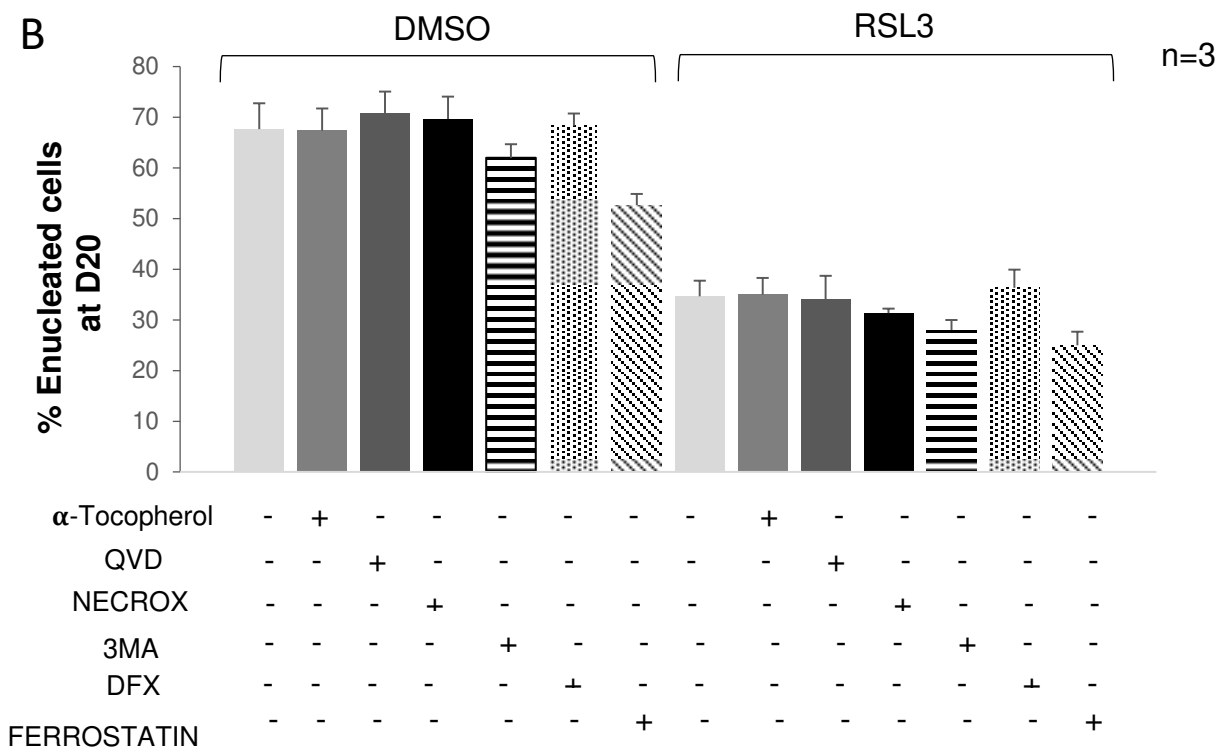


Figure 3

A



B



C

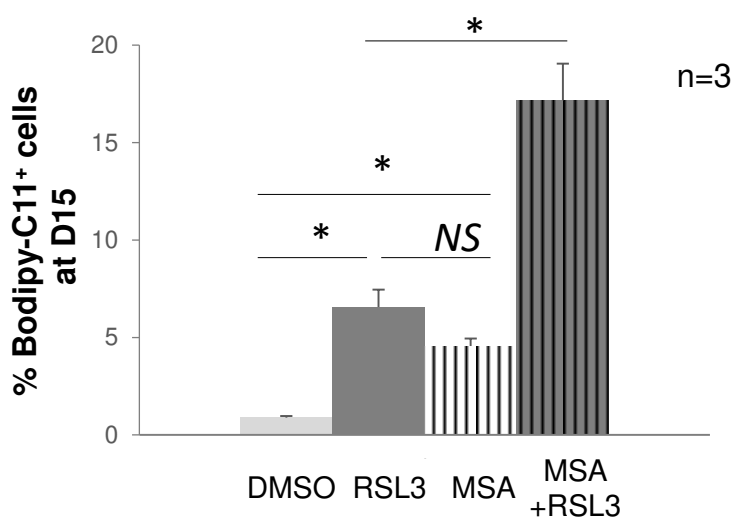


Figure 4

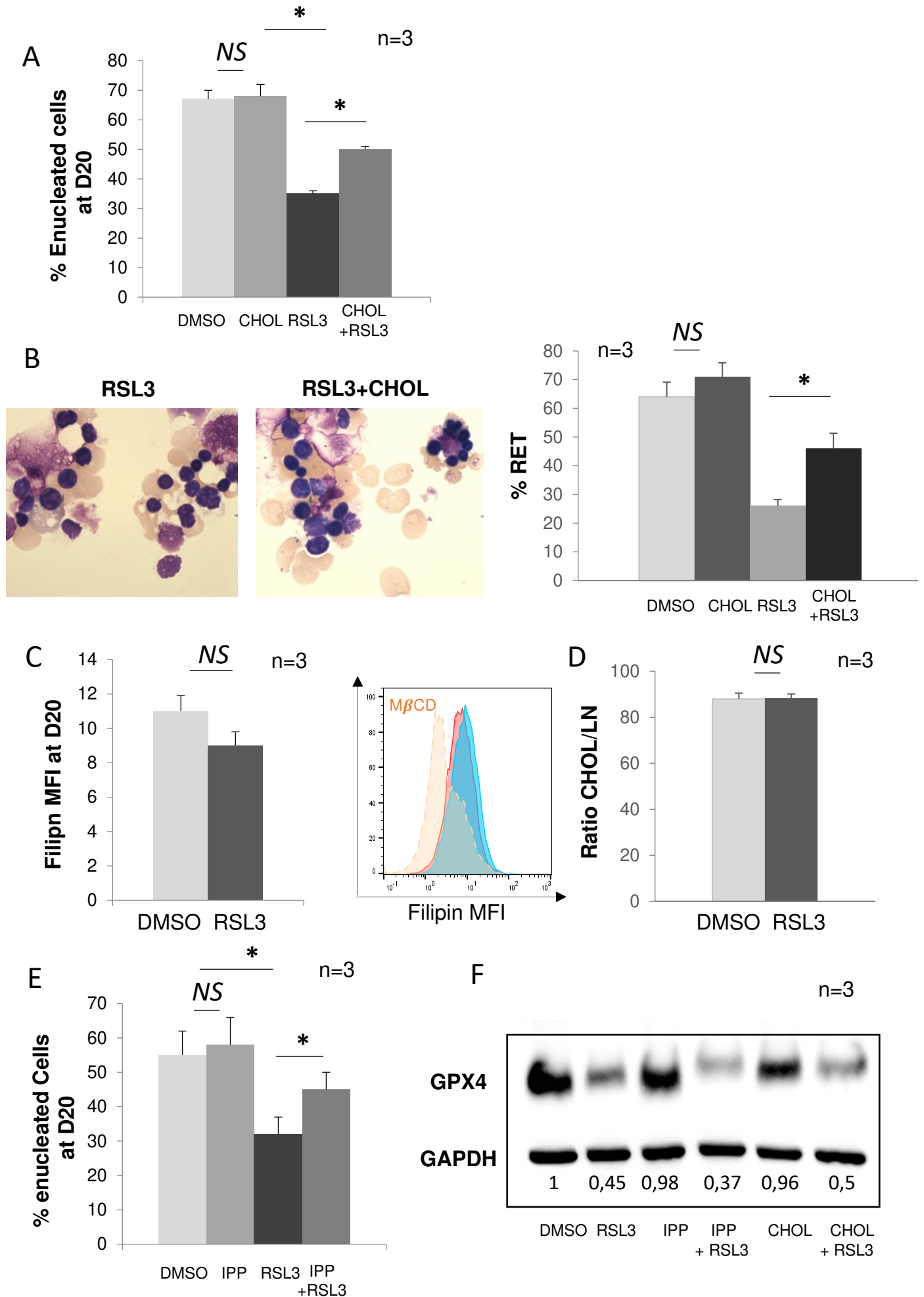


Figure 5

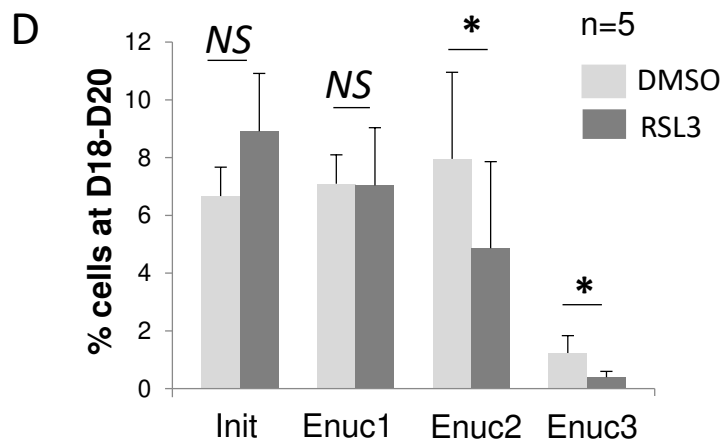
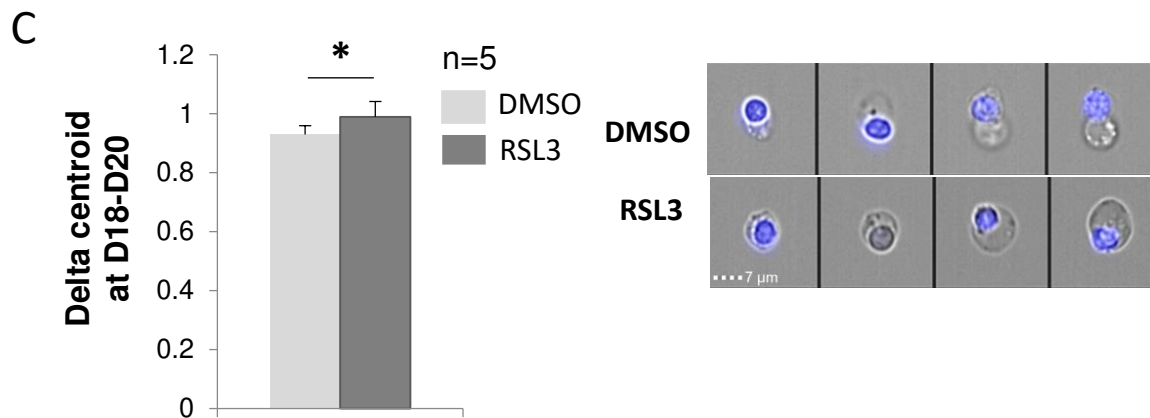
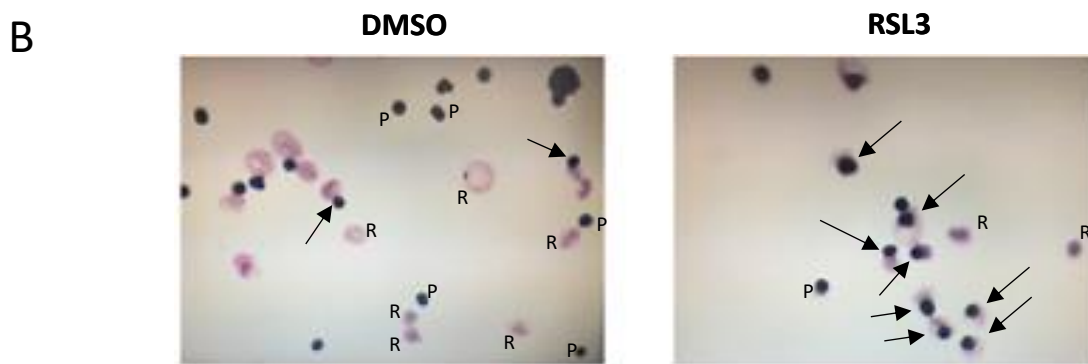
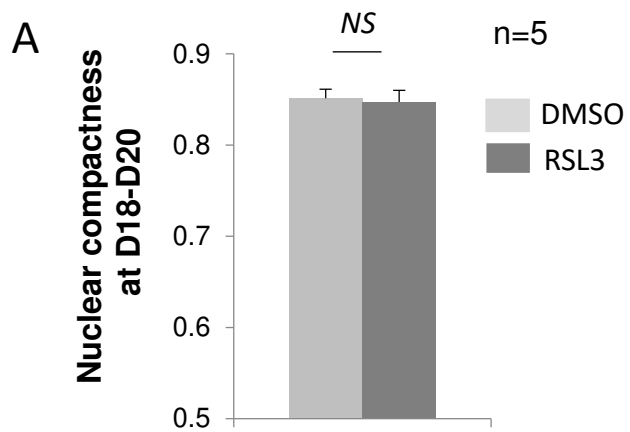
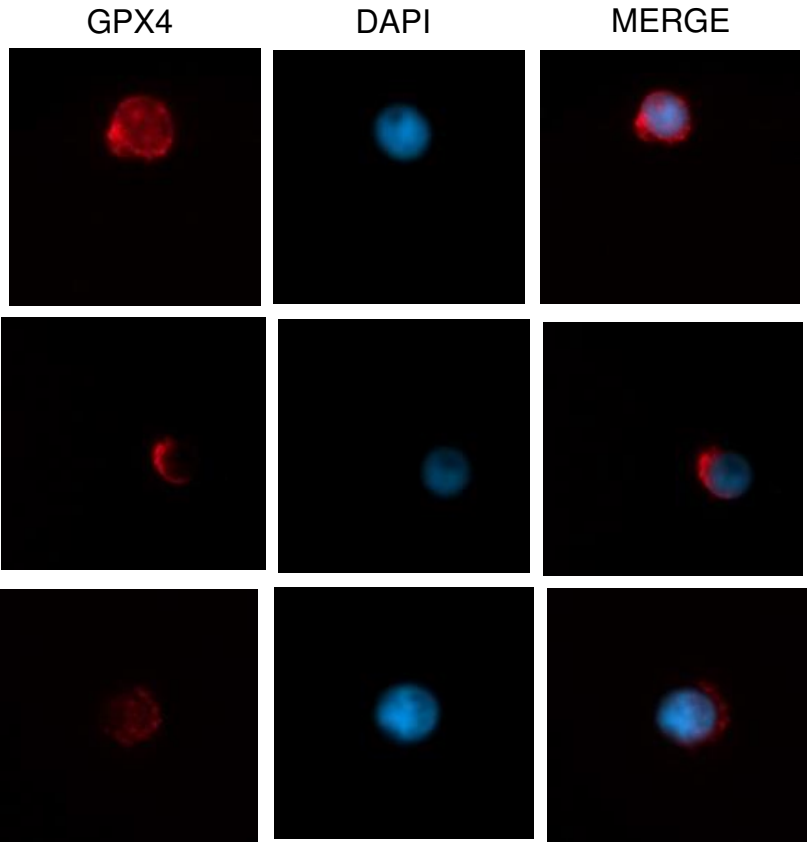
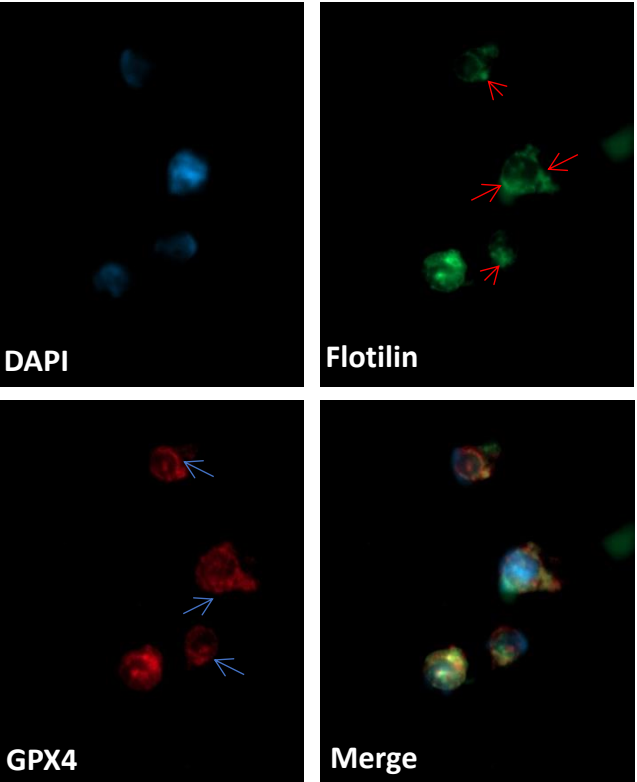


Figure 6

A



B



C

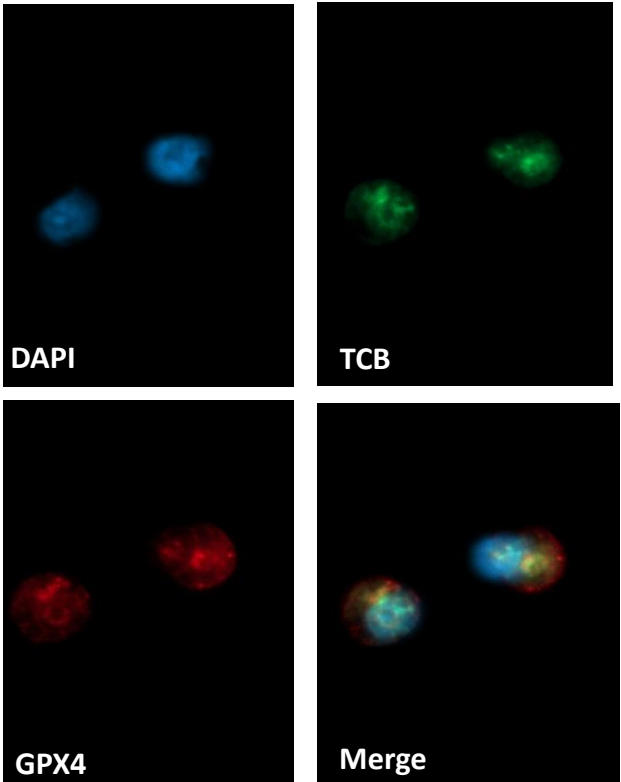
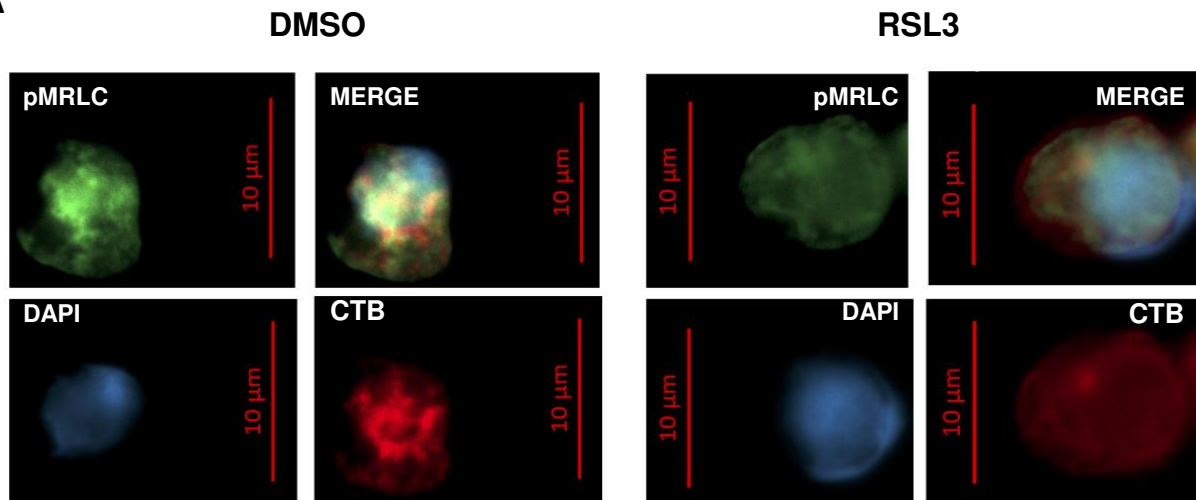
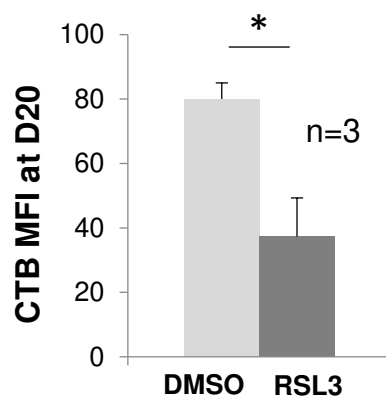


Figure 7

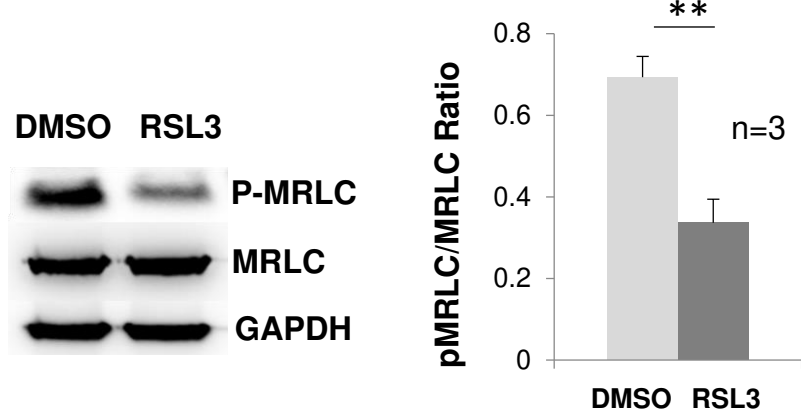
A



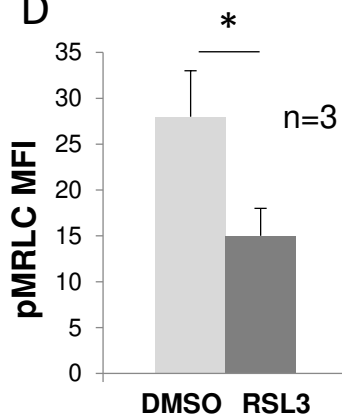
B



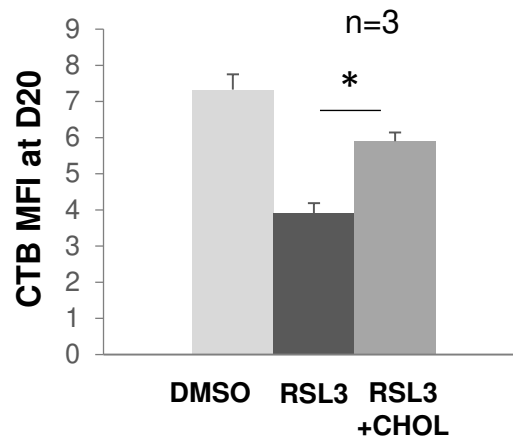
C



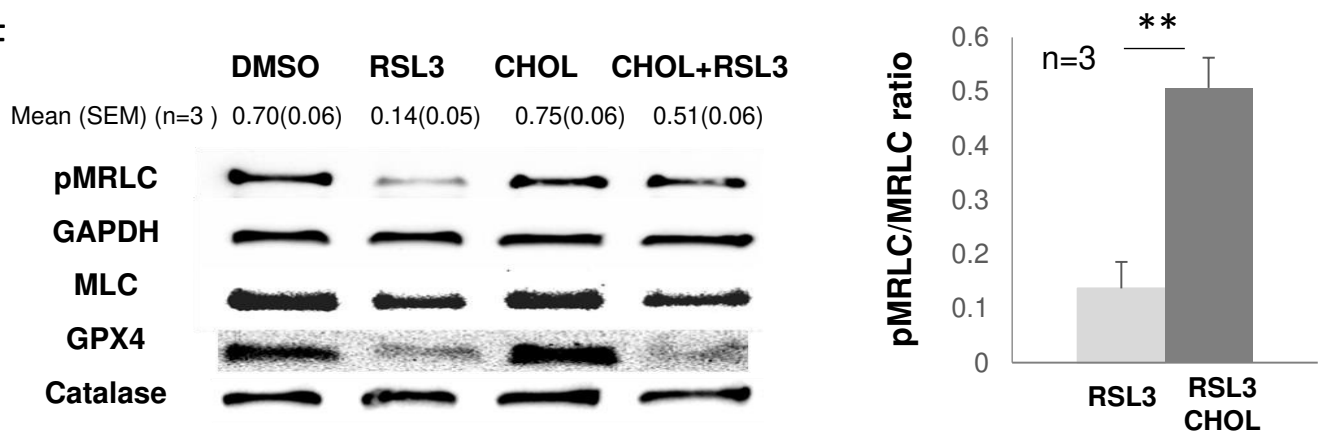
D



E



F



Annexe IV: Article 3

PIEZO1 activation delays erythroid differentiation of normal and hereditary xerocytosis-derived human progenitor cells

Alexis Caulier,^{1,2*} Nicolas Jankovsky,^{1*} Yohann Demont,³ Hakim Ouled-Haddou,¹ Julien Demagny,⁴ Corinne Guitton,⁵ Lavinia Merlusca,² Delphine Lebon,^{1,2} Pascal Vong,¹ Aurélien Aubry,¹ Agnès Lahary,⁶ Christian Rose,⁷ Sandrine Gréaume,⁸ Emilie Cardon,¹ Jessica Platon,¹ Halima Ouadid-Ahidouch,⁹ Jacques Rochette,^{1,10} Jean-Pierre Marolleau,^{1,2} Véronique Picard¹¹ and Loïc Garçon^{1,4,10}

¹EA4666 HEMATIM, Université Picardie Jules Verne, Amiens; ²Service des Maladies du Sang, CHU Amiens, Amiens; ³Unité de Thérapie Cellulaire, CHU Amiens, Amiens; ⁴Service d'Hématologie Biologique, CHU Amiens; ⁵Service de Pédiatrie Générale, CHU Bicêtre, AP- HP, Le Kremlin-Bicêtre; ⁶Laboratoire d'Hématologie, CHU Rouen, Rouen; ⁷Service d'Oncologie et d'Hématologie, Hôpital Saint Vincent de Paul, Lille; ⁸Etablissement Français du Sang (EFS) de Normandie, Bois-Guillaume; ⁹EA4667 Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire, Université Picardie Jules Verne, Amiens; ¹⁰Laboratoire de Génétique Moléculaire, CHU Amiens, Amiens and ¹¹Laboratoire d'Hématologie, AP-HP, Le Kremlin-Bicêtre, France

**AC and NJ contributed equally to this work.*



Ferrata Storti Foundation

PIEZO1 activation delays erythroid differentiation of normal and hereditary xerocytosis-derived human progenitor cells

Alexis Caulier,^{1,2*} Nicolas Jankovsky,^{1*} Yohann Demont,³ Hakim Ouled-Haddou,¹ Julien Demagny,⁴ Corinne Guitton,⁵ Lavinia Merlusca,² Delphine Lebon,^{1,2} Pascal Vong,¹ Aurélien Aubry,¹ Agnès Lahary,⁶ Christian Rose,⁷ Sandrine Gréaume,⁸ Emilie Cardon,¹ Jessica Platon,¹ Halima Ouadid-Ahidouch,⁹ Jacques Rochette,^{1,10} Jean-Pierre Marolleau,^{1,2} Véronique Picard¹¹ and Loïc Garçon^{1,4,10}

¹EA4666 HEMATIM, Université Picardie Jules Verne, Amiens; ²Service des Maladies du Sang, CHU Amiens, Amiens; ³Unité de Thérapie Cellulaire, CHU Amiens, Amiens; ⁴Service d'Hématologie Biologique, CHU Amiens; ⁵Service de Pédiatrie Générale, CHU Bicêtre, AP-HP, Le Kremlin-Bicêtre; ⁶Laboratoire d'Hématologie, CHU Rouen, Rouen; ⁷Service d'Oncologie et d'Hématologie, Hôpital Saint Vincent de Paul, Lille; ⁸Etablissement Français du Sang (EFS) de Normandie, Bois-Guillaume; ⁹EA4667 Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire, Université Picardie Jules Verne, Amiens; ¹⁰Laboratoire de Génétique Moléculaire, CHU Amiens, Amiens and ¹¹Laboratoire d'Hématologie, AP-HP, Le Kremlin-Bicêtre, France

*AC and NJ contributed equally to this work.

Haematologica 2020
Volume 105(3):610-622

Correspondence:

LOÏC GARÇON
garcon.loic@chu-amiens.fr

Received: February 11, 2019.

Accepted: August 9, 2019.

Pre-published: August 14, 2019.

doi:10.3324/haematol.2019.218503

Check the online version for the most updated information on this article, online supplements, and information on authorship & disclosures: www.haematologica.org/content/105/3/610

©2020 Ferrata Storti Foundation

Material published in *Haematologica* is covered by copyright. All rights are reserved to the Ferrata Storti Foundation. Use of published material is allowed under the following terms and conditions:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>.

Copies of published material are allowed for personal or internal use. Sharing published material for non-commercial purposes is subject to the following conditions:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>,

sect. 3. Reproducing and sharing published material for commercial purposes is not allowed without permission in writing from the publisher.



ABSTRACT

Hereditary xerocytosis is a dominantly inherited red cell membrane disorder caused in most cases by gain-of-function mutations in PIEZO1, encoding a mechanosensitive ion channel that translates a mechanic stimulus into calcium influx. We found that PIEZO1 was expressed early in erythroid progenitor cells, and investigated whether it could be involved in erythropoiesis, besides having a role in the homeostasis of mature red cell hydration. In UT7 cells, chemical PIEZO1 activation using YODA1 repressed glycophorin A expression by 75%. This effect was PIEZO1-dependent since it was reverted using specific short hairpin-RNA knockdown. The effect of PIEZO1 activation was confirmed in human primary progenitor cells, maintaining cells at an immature stage for longer and modifying the transcriptional balance in favor of genes associated with early erythropoiesis, as shown by a high *GATA2/GATA1* ratio and decreased α/β -globin expression. The cell proliferation rate was also reduced, with accumulation of cells in G0/G1 of the cell cycle. The PIEZO1-mediated effect on UT7 cells required calcium-dependent activation of the NFAT and ERK1/2 pathways. In primary erythroid cells, PIEZO1 activation synergized with erythropoietin to activate STAT5 and ERK, indicating that it may modulate signaling pathways downstream of erythropoietin receptor activation. Finally, we studied the *in-vitro* erythroid differentiation of primary cells obtained from 14 *PIEZO1*-mutated patients, from 11 families, carrying ten different mutations. We observed a delay in erythroid differentiation in all cases, ranging from mild (n=3) to marked (n=8). Overall, these data demonstrate a role for PIEZO1 during erythropoiesis, since activation of PIEZO1 - both chemically and through activating mutations - delays erythroid maturation, providing new insights into the pathophysiology of hereditary xerocytosis.

Introduction

PIEZO proteins were identified as a family of mechanically activated transducers, first described in neuronal cell lines, which convert mechanical forces into biological signals.¹ PIEZO1 is a large, three-blade propeller-shaped protein displaying 38 transmembrane-helix domains, and is encoded by the broadly

expressed *FAM38A* gene^{2,3} (GTEx Project) (<https://gtexportal.org/home/gene/PIEZO1>). Activation of the mechanosensitive ion channel PIEZO1 has a significant effect on red blood cell physiology. Under physiological conditions, PIEZO1 regulates ATP release from human mature erythrocytes,⁴ and has been shown to control red blood cell volume and hydration homeostasis through ion balance.⁵ PIEZO1 induces a cationic current that develops quickly after activation of the protein by a mechanical stress; this activation is followed by a rapid inactivation determined by the C-terminal extracellular domain and the inner pore helix.⁶ PIEZO1 is a non-selective channel although it presents a preferential conductance of monovalent cations, and a significant permeability to calcium (Ca²⁺).^{1,7} *PIEZO1* gain-of-function mutations have been associated with most cases of hereditary xerocytosis (HX), leading to either a slower inactivation or altered channel kinetics.^{8–11} These mutations induce excessive Ca²⁺ influx and secondary activation of the Gardos channel in red cells, thereby causing potassium (K⁺) leakage, water loss, and erythrocyte dehydration.^{12,13}

So far, the role of PIEZO1 during erythropoiesis has only been described in mature erythrocytes. However, it is also expressed earlier in human erythroid progenitors.^{8,14} In many cell types such as epithelial, urothelial and endothelial cells, PIEZO1 has been involved in regulation of the cell cycle, proliferation and differentiation.^{15–18} Prompted by a recent report that a PIEZO1 mutation could mimic myelodysplastic syndrome with megaloblastic features,¹⁹ we performed an extensive and comprehensive investigation of PIEZO1 expression and function using primary human erythroid progenitor cells. We investigated consequences of its activation either by the selective activator YODA1 in normal human erythroid progenitors or by activating mutations in HX-derived hematopoietic progenitors from 14 patients carrying ten different mutations. We observed that PIEZO1 activation in our models modified the kinetics of erythropoiesis, inducing a delay in terminal erythroid differentiation. Our results suggest that PIEZO1 plays a key role during human erythroid differentiation.

Methods

The primary cell culture protocol, multiparametric flow cytometry (MFC), live imaging flow cytometry (IFC), western blot, immunofluorescence, quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis and reagents are detailed in the *Online Supplementary Methods*.

Cell lines culture

The UT7 cell line was maintained in α -minimum essential medium (Dominique Dutscher) supplemented with 10% fetal calf serum (Eurobio) and cytokines. Two subclones were used: the UT7/GM clone and the UT7/EPO clone. The UT7/GM clone was used as a model of erythropoietin (EPO)-driven differentiation, proliferating under 5 ng/mL recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; Miltenyi) and differentiating under 5 U/mL EPO after GM-CSF had been removed by two washes in 1x phosphate-buffered saline.²⁰ The UT7/EPO clone (a gift from Dr. Y.Zermati, Institut Cochin, Paris, France) was used as a model of EPO-driven proliferation, and cultured with 2 U/mL EPO (*Online Supplementary Figure S1*).²¹

Patients' samples and primary cell cultures

HX hematopoietic cells were obtained from blood samples collected into EDTA or from phlebotomy bags after patients' informed consent in accordance with the Helsinki declaration. This study was conducted in compliance with French legislation on non-interventional studies. Patients' data were collected directly from their medical records or through the HX French Cohort registry, approved by the National Commission on Informatics and Liberty. The diagnosis of HX was based on clinical and biological features and a typical osmotic gradient ektacytometry curve before genetic testing. Thirteen of the patients in this study were recently extensively described.²² Control samples were obtained from blood or mobilized peripheral blood mononuclear cells (MNC) of healthy subjects. The MNC were isolated using density gradient-centrifugation (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare) and CD34⁺ cells were sorted by magnetic microbead separation on MACS columns (AutoMACS Separator). The complete protocol for erythroid differentiation is described in *Online Supplementary Figures S1 and S2* and detailed in the *Online Supplementary Methods*.

Lenti/retroviral production and cell infection

Four short hairpin (Sh) RNA against *PIEZO1* (Sh-PIEZO1) and one control scrambled ShRNA (Sh-SCR) cloned in pLKO.1-CMV-tGFP vector were designed using the Mission[®] shRNA tool and purchased from Sigma-Aldrich (detailed sequences are provided in *Online Supplementary Table S1*). Specific anti-PIEZO1 targeting was verified using an online alignment research tool (nucleotide BLAST[®], NCBI). Viral production was ensured in the HEK293T cell line, after transfection using Lipofectamine[®] LTX with Plus[™] reagent (Thermo Fisher Scientific) in antibiotic-free, high-glucose Dulbecco modified Eagle medium (Dominique Dutscher). Lentiviral supernatant was harvested from day 2 to 4, and filtered through a 0.45 μ M polyvinylidene fluoride membrane (Millex-HV 0.45 μ M 33 mm, Merck-Millipore) before ultracentrifugation on day 4 (100,000 g for 90 min at 4°C, Optima L-80XP, Beckman-Coulter). We used a mix of the four ShRNA to knockdown *PIEZO1* in the UT7/EPO cell line. Infection was performed overnight with 8 μ g/mL polybrene (Sigma-Aldrich). In UT7/EPO cells, 10 μ L of each supernatant were used to infect 5x10⁵ cells, and were sufficient to induce >90% GFP, both with the Sh-SCR and Sh-PIEZO1 mix. Forty-eight hours after transduction, cells were washed in 50 mL 1x phosphate-buffered saline and cultured for an additional 3 days in the presence of dimethylsulfoxide (DMSO) or YODA1 before MFC staining. The retroviral MigR vector containing dominant-negative MEK was a generous gift from Prof. S. Giraudier (Hôpital Saint-Louis, Paris, France).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using two-tailed *P* values and parametric tests. The α value for statistical significance was set at 0.05. For quantitative variables we used a Student *t*-test for paired or unpaired samples depending on the experiment under consideration. All numerical values are expressed as mean values \pm standard deviation.

Results

PIEZO1 is expressed at an early stage during *in vitro* erythropoiesis of human CD34⁺ cells

We first assessed *PIEZO1* expression during synchronized human *in vitro* erythroid differentiation as described in *Online Supplementary Figure S2B*. *PIEZO1* mRNA was

preferentially expressed in CD34⁺ cells and in early stages of erythropoiesis from day 4 to 10 (corresponding to burst-forming unit-erythroid/colony-forming unit-erythroid/proerythroblast in our culture system) then decreased during terminal maturation (Figure 1A). This was in agreement with previously published RNA-sequencing analyses on erythroid precursors.^{14,23,24}

Expression of glycophorin A (GPA) was measured in parallel as a positive marker of erythroid differentiation (Figure 1B). Similar results were observed at the protein level using MFC (Figure 1C, D). The specificity of PIEZO1 antibody staining using MFC was verified by western blot and immunofluorescence assays (Online Supplementary Figure S4).

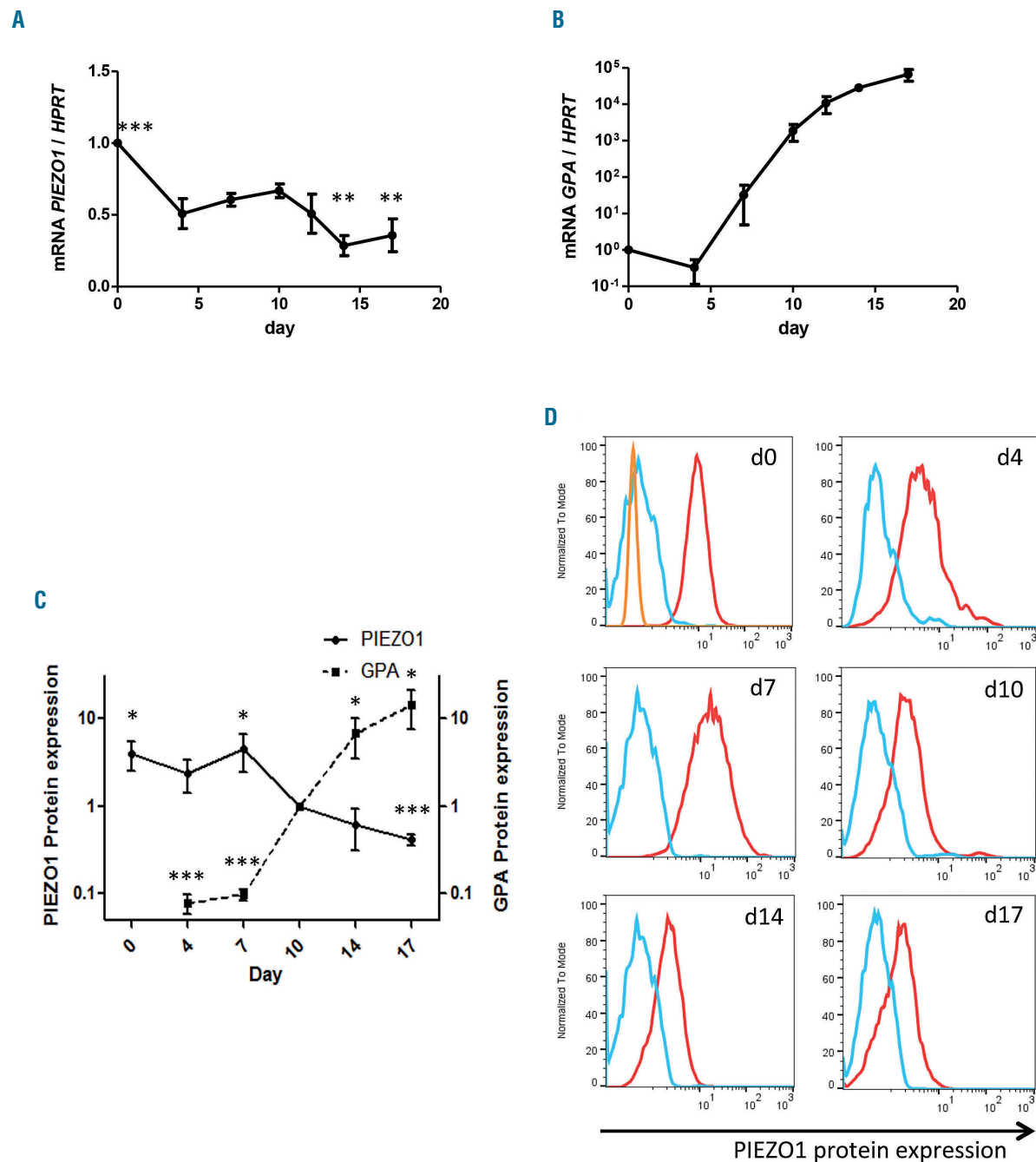


Figure 1. PIEZO1 expression during human *in vitro* erythroid differentiation. PIEZO 1 expression was assessed at day 4 in CD45^{low}/CD123⁺/CD34⁺/CD36⁺ cells, and at day 7 in CD36⁺ cells, for both the gene and protein expression experiments. (A) *PIEZO1* mRNA expression (determined by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-qPCR) relative to *HPRT* expression, during synchronized erythroid differentiation. Differential expression relative to day 0. Statistical analysis was made compared to day 10. No significant change was seen at days 4, 7, and 12. (B) *Glycophorin A* (*GPA*) mRNA expression (determined by RT-qPCR) relative to *HPRT* expression, during synchronized erythroid differentiation. Reference was day 0. (C) Kinetics of relative *PIEZO1* protein expression during *in-vitro* erythroid differentiation, in parallel to relative *GPA* membrane expression. For both, expression at each time point was assessed by multiparametric flow cytometry (MFC) (mean fluorescence intensity at the time point relative to that at day 10.) (D) MFC histograms of *PIEZO1* protein expression assessed at different culture time points (red). We used both the secondary antibody alone (blue) and a non-specific rabbit anti HLA-DR1 antibody (orange) as controls. (n=3 for all experiments). ***P<0.001; **P<0.01; *P<0.05.

YODA1 inhibits cell proliferation and blocks erythroid differentiation in a PIEZO1-dependent manner in UT7 cells

The UT7/GM cell line was used as a model of EPO-induced erythroid differentiation. Indeed, these cells expressed a low level of GPA under exposure to GM-CSF, and acquired GPA in the presence of EPO (*Online Supplementary Figure S1A-C*). We tested YODA1, a specif-

ic PIEZO1 activator,²⁵ at increasing concentrations and selected 5 μ M for further experiments in these cells (*Online Supplementary Figure S3A, B*). At this concentration, YODA1 decreased cell proliferation (Figure 2A) and increased the percentage of cells in the G0/G1 phase (Figure 2B). No difference in cell mortality or apoptosis rate was noted (*Online Supplementary Figure S3C, D*). Under the differentiation condition using 5 U/mL EPO,

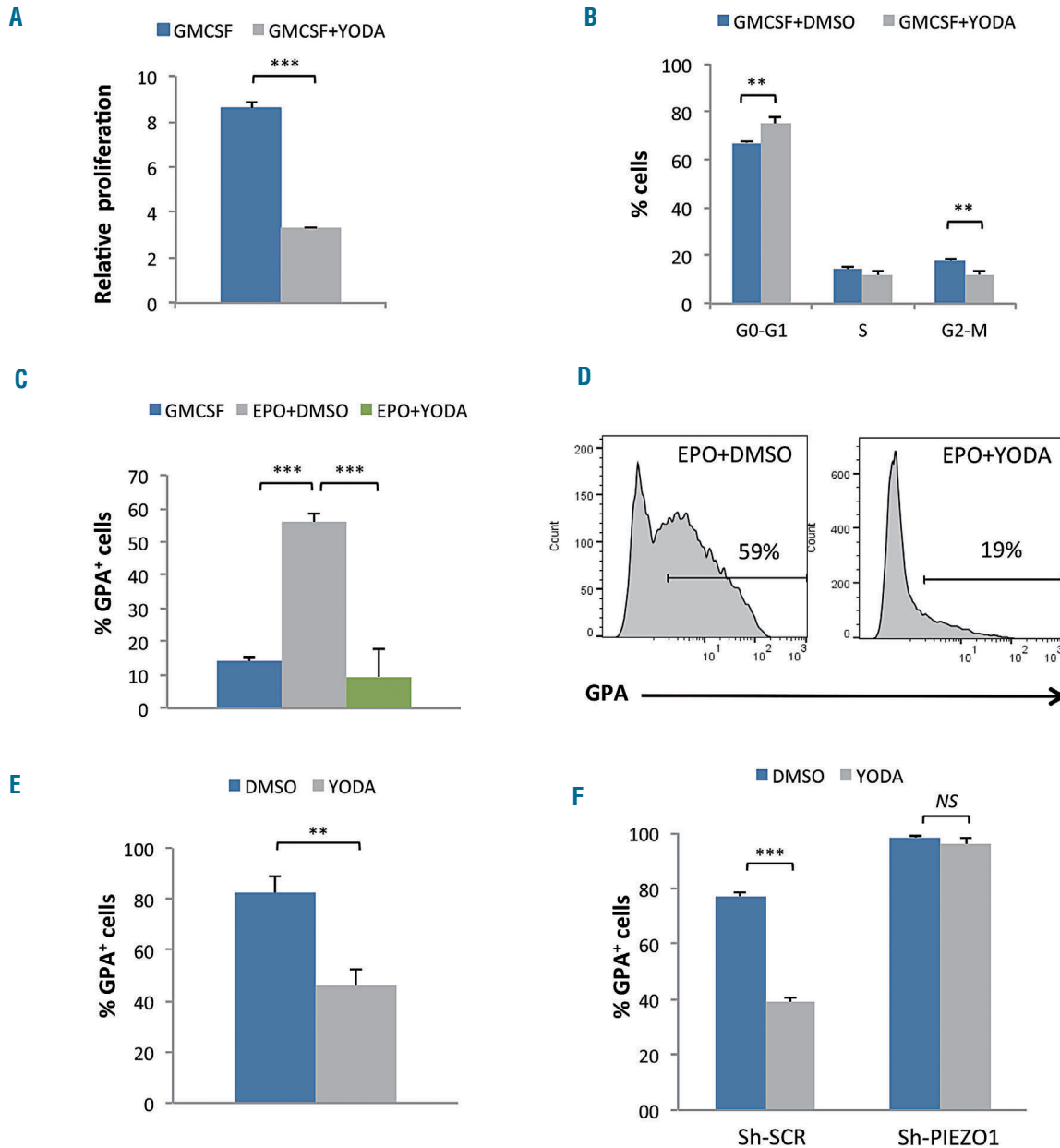


Figure 2. Effect of PIEZO1 chemical activation on the proliferation and differentiation of UT7 cells. Glycophorin A (GPA) expression and cell proliferation were assessed after 72 h of culture in medium containing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GMCSF) or erythropoietin (EPO). (A) In the UT7/GM cell line, stimulation with 5 μ M YODA1 reduced cell expansion compared to that induced by dimethylsulfoxide (DMSO) (2.6 fold). (B) In the UT7/GM cell line exposure to 5 μ M YODA1 in GMCSF-containing medium led to cell accumulation in the G0/G1 phase of the cycle (67 \pm 1% with DMSO vs. 75 \pm 3% with YODA1), and a significant decrease in cells in the G2/M phase (18 \pm 1% with DMSO vs. 12 \pm 2% with YODA1). (C) Stimulation with 5 U/mL EPO induced partial erythroid differentiation in UT7/GM cells, as shown by GPA acquisition (56 \pm 3% vs. 14 \pm 2% in GMCSF-containing medium), which was strongly inhibited after PIEZO1 chemical activation using 5 μ M YODA1 (9 \pm 8% with YODA1 vs. 56 \pm 3% with EPO+DMSO). (D) Representative multiparametric flow cytometry histograms showing the repression of EPO-mediated GPA expression after exposure to YODA1 in UT7/GM cells. (E) GPA repression was also observed in UT7/EPO cells after exposure to 5 μ M YODA1 for 3 days (82 \pm 6% vs. 46 \pm 7% with DMSO). (F) In UT7/EPO cells transduced with Sh-SCR, YODA1 repressed GPA expression (39 \pm 1.8% vs. 77 \pm 1.1% with DMSO) whereas infection with a mixture of four different Sh-PIEZO1 abolished the YODA1-mediated inhibition of GPA (96 \pm 2% with YODA1 vs. 98 \pm 0.4%, $P=NS$). (n=3 for all experiments, *** P <0.001; ** P <0.01).

YODA1 significantly repressed GPA induction (Figure 2C, D), and this effect was dose-dependent (Online Supplementary Figure S3A). Using the UT7/EPO cell line that proliferates in the presence of EPO and expresses a high level of GPA at baseline (Online Supplementary Figure S1A, right), we observed a similar dose-dependent GPA downregulation after exposure to YODA1 (Figure 2E and Online Supplementary Figure S3B, E). We ruled out any YODA1 off-target effect using a Sh-RNA lentiviral strategy that specifically knocks down PIEZO1. Transduction efficiency was >90%, as assessed by GFP expression. The Sh-RNA-mediated *PIEZO1* decrease was 65% at the RNA level (Online Supplementary Figure S4A). At the protein level, the decrease was 50% as assessed by MFC (Online Supplementary Figure S4B) in comparison to the level in cells transduced with a Sh-scrambled control (Sh-SCR). The *PIEZO1* decrease was confirmed using western blotting and immunofluorescence (Online Supplementary Figure S4C, D). Following exposure to YODA1, GPA expression decreased in Sh-SCR-transduced cells but not in cells transduced with Sh-*PIEZO1* (Figure 2F). The effect was related to GFP intensity, being weaker in cells expressing Sh-*PIEZO1* at a lower level (Online Supplementary Figure S4E). Sh-*PIEZO1* had the opposite effect of YODA1 on GPA expression since it enhanced erythroid differentiation by increasing the percentage of GPA⁺ cells compared to the control Sh-SCR. (Figure 2F and Online Supplementary Figure S4E). Sh-*PIEZO1* did not revert the decreased proliferation induced by YODA1 exposure, and induced a reduced proliferation rate by itself in comparison to Sh-SCR (Online Supplementary Figure S4F).

PIEZO1 activation delays erythroid differentiation in human CD34⁺-derived erythroid cells

We then investigated whether the erythroid blockage induced by YODA1 in leukemic cell lines was confirmed in human primary cells. Sorted CD34⁺ cells were driven into erythroid differentiation (Online Supplementary Figure S2A). A dose of 1 μ M YODA1 was selected for drug exposure based on dose-escalation data (Online Supplementary Figure S5A). Erythroid differentiation was assessed on day 10 by MFC and cytology. YODA1 reduced cell amplification without increasing cell death or apoptosis (Online Supplementary Figure S5B-D). Importantly, it led to a drastic delay in GPA acquisition, with accumulation of immature CD36⁺/CD117⁺ erythroblasts and a decrease in CD71⁺/GPA^{high} mature cells (Figure 3A-D). These results were confirmed by cytology, which showed an increase in immature erythroid precursors after exposure to YODA1 (Figure 3E, F). To investigate the timing of the YODA1 effect more precisely, we synchronized the cell culture (Online Supplementary Figure S2B). CD36⁺/GPA⁺ colony-forming unit-erythroid cells were sorted on day 7 and exposed sequentially to 1 μ M YODA1 or DMSO from day 7, 10, or 13 to the end of the culture. Red cell terminal differentiation was evaluated as the mean percentage of enucleated cells on day 21. The YODA1 effect was maximal when cells were exposed early, from day 7 to 10, as shown by the significant decrease in the Hoechst negative fraction at day 21 (Online Supplementary Figure S6A, B). A decrease in the ratio of enucleated cells was also observed on cytological analyses after early exposure, with the effect being weaker when YODA1 was administered on day 13 (Online Supplementary Figure S6C). We showed here that erythroid differentiation was delayed but not blocked

after *PIEZO1* activation, since precursors reached final enucleation, but at a slower rate. Taken together, these data argue for a YODA1 effect at the transition between the GPA^{low} and GPA^{high} stages, corresponding to the beginning of the differentiation of erythroid precursors.²⁶

PIEZO1 activation delays erythroid differentiation through transcriptional control

Using RT-qPCR we investigated whether the YODA1-induced delay in erythroid differentiation was driven by global transcriptional control. In human primary erythroid cells, EPO-mediated GPA mRNA induction was inhibited by YODA1, indicating that the GPA repression occurred at the transcriptional level. *PIEZO1* activation also reduced EPO-mediated α - and β -globin mRNA induction (Figure 4A). Since *GATA2* expression during erythropoiesis is associated with the early proliferative stage while *GATA1* is the key protagonist of terminal differentiation, we evaluated the *GATA2/GATA1* mRNA ratio after exposure to YODA1. It increased significantly in comparison with the ratio after exposure to DMSO (Figure 4B). A broader analysis of erythroid gene expression confirmed that primary erythroblasts exposed to YODA1 displayed an immature erythroid profile, with higher expression of *BMI1* and *STAT5A* mRNA and lower *ALAS2*, *EPOR*, *AHSP* and *SLC4A1* mRNA expression (Figure 4C).

YODA1-induced inhibition of erythroid differentiation is Ca²⁺-dependent and does not require activation of the Gardos channel

PIEZO1-mediated red cell dehydration in HX is Ca²⁺-dependent; since *PIEZO1* is a non-selective cation channel, we next evaluated whether this was also the case during erythropoiesis. In UT7/GM cells, YODA1 caused a strong dose-dependent increase in cytosolic Ca²⁺ (Figure 5A). This effect was abolished in Ca²⁺-free medium, consistent with YODA1 causing a strong Ca²⁺ influx from the extracellular to the intracellular compartment (Figure 5A, B). Ca²⁺ chelation using 2 mM ethylene glycol tetra-acetic acid (EGTA) totally blocked the YODA1-mediated decrease of GPA; this was rescued by addition of 2 mM calcium chloride (Figure 5C). The same effect was observed after intracellular Ca²⁺ chelation using BAPTA-AM (data not shown). Since red cell dehydration in *PIEZO1*-HX involves a Ca²⁺-dependent secondary activation of the Gardos channel,²⁰ we investigated whether the effect of *PIEZO1* on erythroblasts was also Gardos-dependent. As shown in Figure 5D, in UT7/GM cells, Senicapoc, a selective Gardos channel inhibitor, did not revert the YODA1-associated blockade of GPA, indicating that YODA1-induced inhibition of erythroid differentiation did not require secondary activation of the Gardos channel.

PIEZO1 effect on erythroid differentiation involves modulation of NFAT, ERK1/2, and STAT5 pathways in UT7 cells and human primary erythroblasts

We next investigated Ca²⁺-dependent signaling pathways activated downstream *PIEZO1* in erythroid cells. Since NFAT is a well-known target of Ca²⁺-signaling in many cell types,²⁷ we evaluated whether it was involved in erythroid cells. Calcineurin inhibition using 5 μ M tacrolimus completely blocked the YODA1-induced GPA repression in UT7/EPO cells (Figure 6A). Moreover, exposure to YODA1 led to substantial nuclear translocation of NFATc1, significantly increasing the similarity score value

compared to DMSO (Figure 6B, C, and *Online Supplementary Figure S7A*). These data argue for a role of the PIEZO1/Ca²⁺/NFAT pathway in the control of erythroid differentiation. We also tested whether the main transduction pathways associated with EPO signaling were involved. We used a strategy based on: (i) protein

phosphorylation measurements after stimulation with YODA1 and/or cytokines in cell lines and primary cells and (ii) chemical inhibitors, assuming that inhibition of any pathway downstream of PIEZO1 would revert the YODA1-mediated phenotype. We tested two main pathways: ERK1/2 and STAT5. The phospho-ERK inhibitor

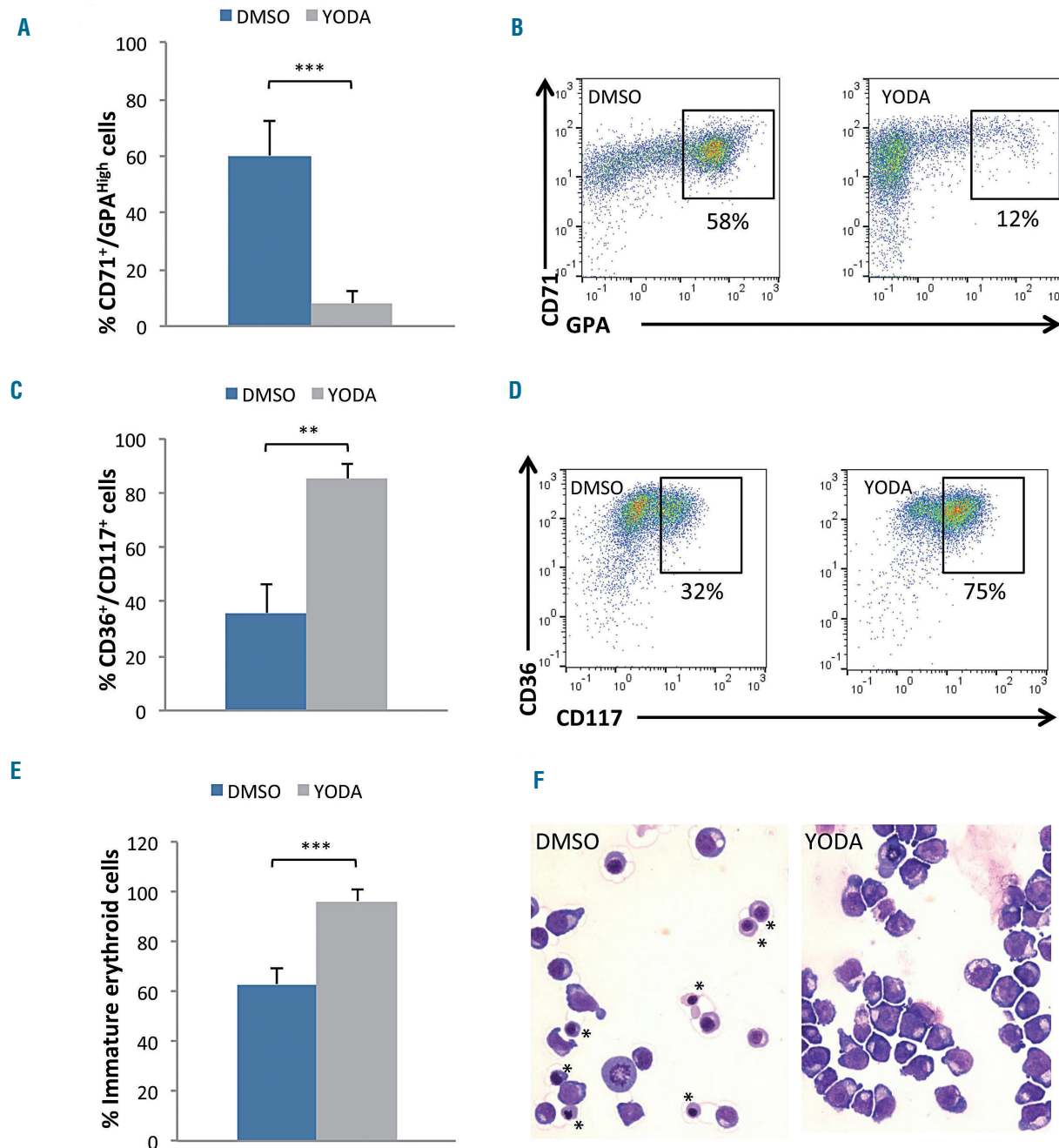


Figure 3. PIEZO1 chemical activation delayed erythroid differentiation of human primary CD34⁺-derived cells. (A) Exposure to 1 μ M YODA1 for 3 days decreased the mature erythroblastic population expressing CD71 and GPA^{High} [8 \pm 4% vs. 60 \pm 12% with dimethylsulfoxide (DMSO)]; multiparametric flow cytometry (MFC) at day 10. (B) Representative MFC plots showing the decrease in the CD71⁺/GPA^{High} population due to YODA1 (right) compared to the effect of DMSO (left), at day 10. (C) Exposure to 1 μ M YODA1 increased the immature erythroblastic population expressing CD36 and CD117 (85 \pm 5%) compared to that following exposure to DMSO (36 \pm 11%). (D) Representative MFC plots showing the increase in CD36⁺/CD117⁺ population due to YODA1 (right) compared to that due to DMSO (left), at day 10. (E) Excess of immature erythroid cells, i.e., proerythroblasts and basophilic erythroblasts upon exposure to YODA1 compared to exposure to DMSO, assessed by cytology after May-Grünwald-Giemsa (MGG) staining (96 \pm 5% vs. 63 \pm 6%). (F) Representative cytology after MGG staining at day 10 of *in vitro* erythroid differentiation showing a heterogeneous population of erythroblasts at all stages of maturation including the orthochromatic (*) stage in the control (left) compared to a more homogeneous population of immature erythroblasts in the presence of 1 μ M YODA (right). (n=4 in experiment E, n=3 in all other experiments). ***P<0.001; **P<0.01; *P<0.05.

UO126 induced spontaneous GPA expression in the absence of EPO, showing that ERK activation was necessary to maintain UT7/GM cells in an undifferentiated GPA^{low} state. YODA1 did not revert the high GPA expression induced by ERK1/2 inactivation (Figure 6D). The same results were observed using a retrovirus containing a MEK dominant-negative form (Online Supplementary Figure S7B). This indicated that the effect of YODA1 required a functional ERK pathway. Phospho-Flow experiments showed that YODA1 induced strong ERK phosphorylation in UT7/GM cells (Figure 6E). This was confirmed by western blot analysis (*data not shown*). ERK phosphorylation was Ca²⁺-dependent, since it decreased strongly in the presence of EGTA (Figure 6E), and PIEZO1-dependent, since it was abrogated in cells transduced with Sh-PIEZO1 lentivirus (Figure 6F). In human primary erythroid progenitors, no p-ERK1/2 was detected in the absence of EPO. In the presence of EPO, YODA1 synergized with EPO for ERK phosphorylation, consistent with a role for PIEZO1 in the modulation of EPO-dependent ERK signaling in primary cells (Figure 6G). This effect was confirmed by western blot analysis (Online Supplementary Figure S7C). We

observed a similar synergistic effect in EPO-induced STAT5 phosphorylation in primary erythroid cells (Figure 6H), also confirmed by western blotting (Online Supplementary Figure S7D). Of note, no effect of YODA1 on STAT5 phosphorylation was seen in UT7/GM cells, in which STAT5-phosphorylation is not EPO-dependent (Online Supplementary Figure S7E). Taken together, these data argue for a role of PIEZO1 in modulating ERK and STAT5 signaling pathways downstream of EPO-receptor activation in human progenitor cells.

PIEZO1 gain-of-function mutations in hereditary xerocytosis delay erythroid differentiation and mimic the effect of chemical activation

Since most HX patients have *PIEZO1* gain-of-function mutations, we tested whether the same phenotype could be observed during *in vitro* erythroid differentiation from PIEZO1-HX progenitors. Fourteen patients from 11 families (HX #1 to #11) carrying ten different *PIEZO1* mutations were tested (HX#3: 2 siblings; HX#10: 3 siblings). The patients' characteristics are shown in Table 1. Nine phlebotomy samples from five patients [3 families, HX#1

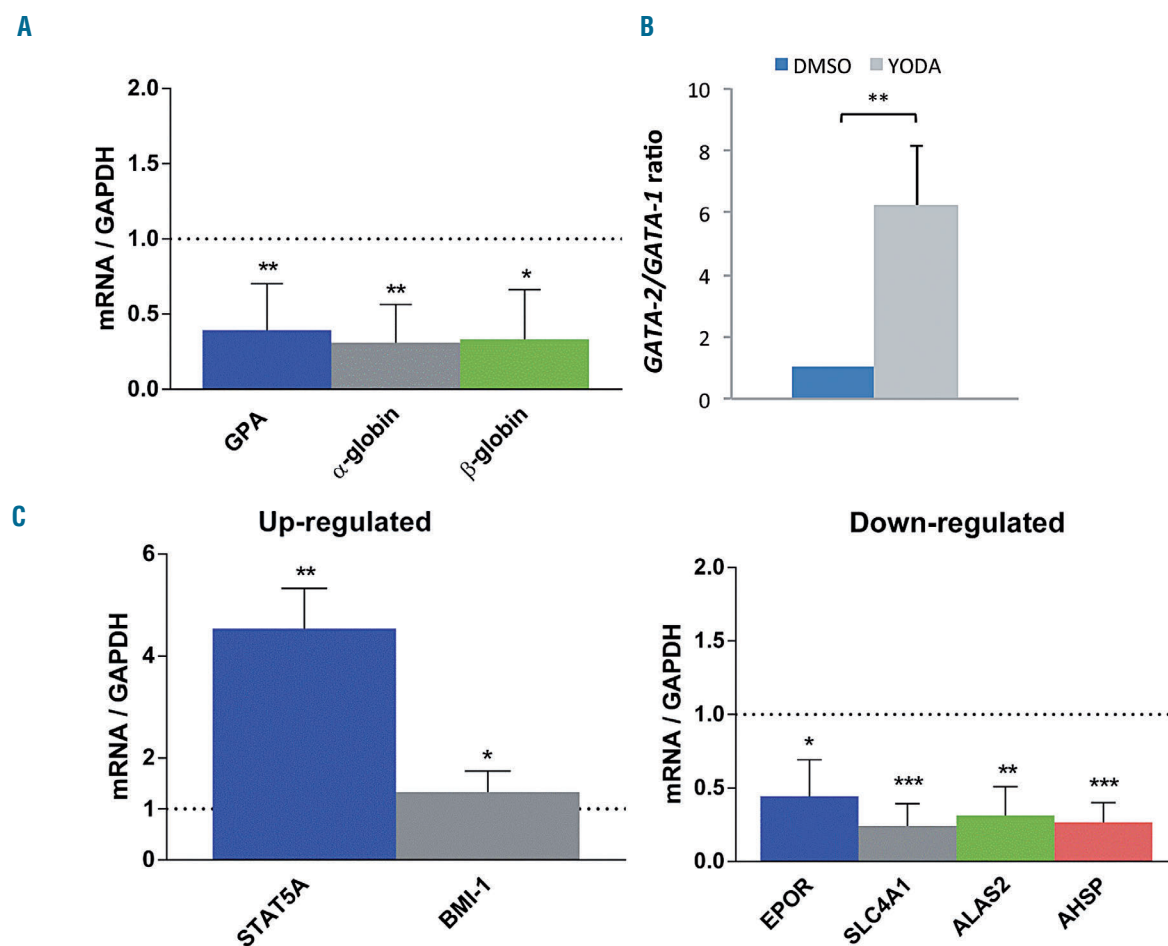


Figure 4. Effect of PIEZO1 activation on the transcriptional program of erythroid differentiation in primary human CD34⁺-derived cells, assessed by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction. For all experiments, primary cells were cultured for 10 days, with 1 μ M YODA1 or dimethylsulfoxide (DMSO) stimulation from day 3 to 10. Gene expression was assessed relative to *GAPDH* expression. (A) Compared to exposure to DMSO, exposure to 1 μ M YODA1 decreased *GPA* mRNA expression (0.49 ± 0.17), β -globin RNA expression (0.4 ± 0.26) and α -globin RNA expression (0.3 ± 0.24). (B) Compared to exposure to DMSO, exposure to 1 μ M YODA1 increased the *GATA2/GATA1* mRNA ratio (6.2 ± 1.9). (C) Stimulation with 1 μ M YODA1 increased *STAT5A* and *BMI-1* expression, and decreased *EPOR*, *SLC4A1*, *ALAS2*, and *AHSP* mRNA expression. ($n=3$ for all experiments); *** $P<0.001$; ** $P<0.01$; * $P<0.05$.

(n=3), HX#2 (n=3), and HX#10(n=3)] were used; CD34⁺ cells were sorted and cultured in erythroid medium. Alternatively, for nine non-phlebotomized patients, MNC were purified from 12 blood samples and were grown directly in the same medium. For controls, we used magnetically sorted CD34⁺ cells from mobilized peripheral blood MNC (n=5), and MNC from healthy control blood samples (n=9). At day 10, we observed a clear delay in erythroid differentiation for seven of the ten *PIEZO1*-HX mutations (8/14 patients), as shown by a decrease in mature CD71⁺/GPA^{High} cells (Figure 7A from sorted CD34⁺ cells and 7B from MNC). A moderate but visible delay

was observed for the three other *PIEZO1*-HX mutations (6/14 patients). The intensity of the phenotype was heterogeneous from one mutation to another (Figure 7B), but was reproducible for a given mutation (Figure 7A). For one patient (HX#1), MNC and CD34⁺ cells were cultured in parallel and a similar phenotype was observed (one representative dot plot is shown Figure 7C). Cytological analyses after staining with May-Grünwald-Giemsa performed in triplicate for this patient confirmed the delayed erythroid differentiation, showing accumulation of immature erythroblasts (Figure 7D, E). MFC data for all HX mutations and controls are shown in *Online Supplementary*

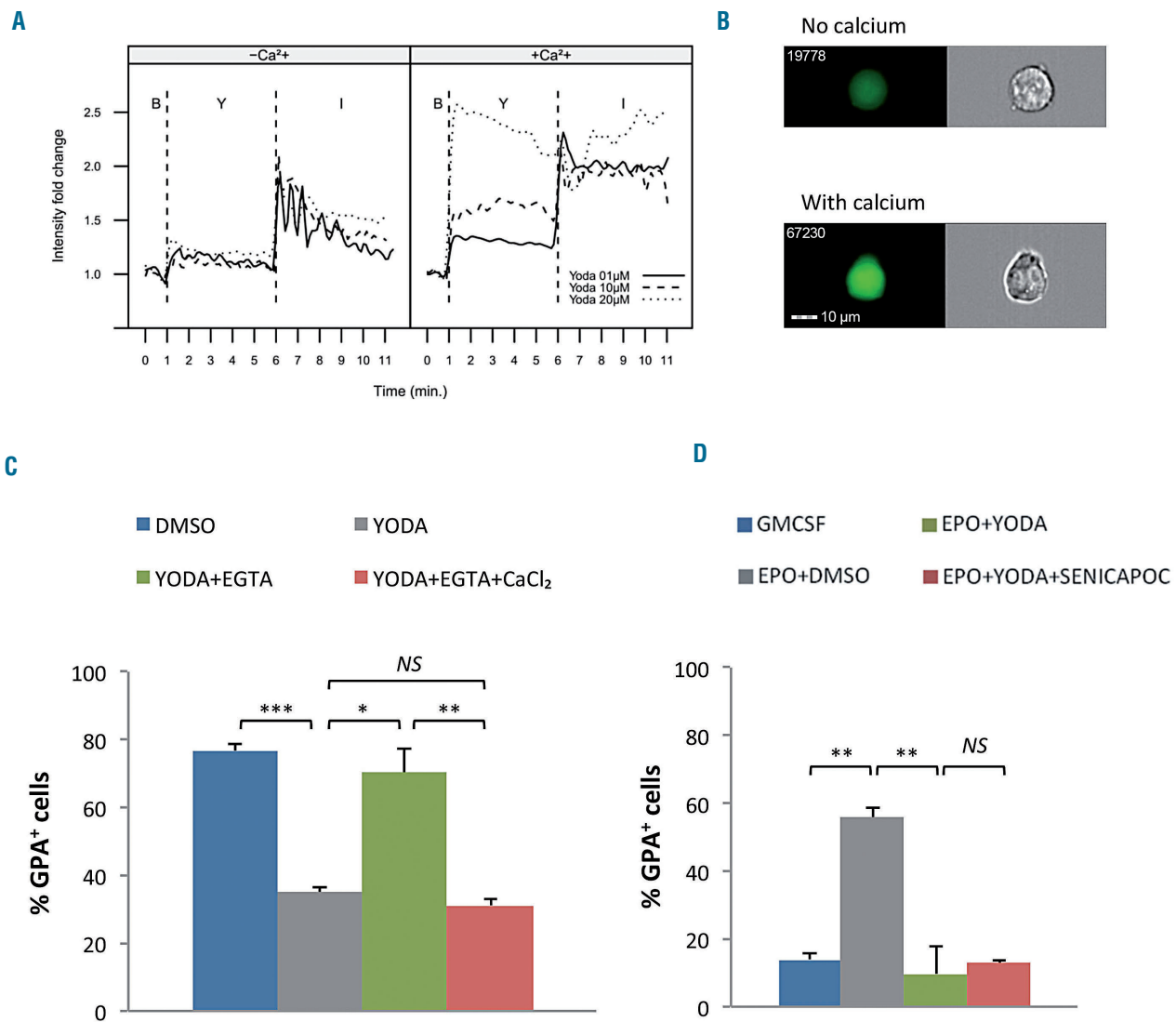


Figure 5. The effect of PIEZO1 activation on erythroid differentiation is calcium-dependent but does not involve a secondary activation of the Gardos channel. (A and B) Cells were incubated with Fluo4-AM for 30 min before stimulation with 5 μ M YODA1. (C and D) UT7/EPO cells were cultured for 72 h after drug stimulation. (A) YODA1 stimulation caused a dose-dependent increase in cytosolic calcium concentration in a calcium-containing medium (+Ca²⁺, right panel). No effect was seen in a calcium-free medium (-Ca²⁺, left panel). YODA1 stimulation ("Y") was performed 60 s after the baseline recording ("B"), before recording for 300 s. The YODA1 concentration was 1 μ M (solid line), 10 μ M (dashed line), or 20 μ M (dotted line). The positive control for an intracellular Ca²⁺ increase was stimulation with 1 μ M ionomycin ("I") recording for 300 s. The image shown here is representative of three identical experiments. (B) Image of intracellular Ca²⁺ content assessed by ImageStreamX using Fluo4-AM cell permeant, after stimulation with 20 μ M YODA1 in Ca²⁺-containing (lower panel) or Ca²⁺-free (upper panel) medium. (C) In UT7/EPO cells, exposure to 5 μ M YODA1 decreased glycoprotein A (GPA) expression (35 \pm 1.4%) compared to the expression following exposure to dimethylsulfoxide (DMSO) (77 \pm 2%). Extracellular Ca²⁺ chelation using 2 mM ethylene glycol tetra-acetic acid (EGTA) prevented the GPA decrease due to YODA1 (70 \pm 7%), and the effect was rescued by adding 2 mM extra calcium chloride (31 \pm 2%). (D) Co-exposure with 4 μ M Senicapoc, a selective Gardos channel inhibitor, did not block the GPA decrease (13 \pm 1%) due to YODA1 stimulation (10 \pm 8%, $P=NS$) in erythropoietin (EPO)-containing medium, compared to DMSO (56 \pm 3%). (n=3 for all experiments; *** $P<0.001$; ** $P<0.01$; * $P<0.05$). GMCSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

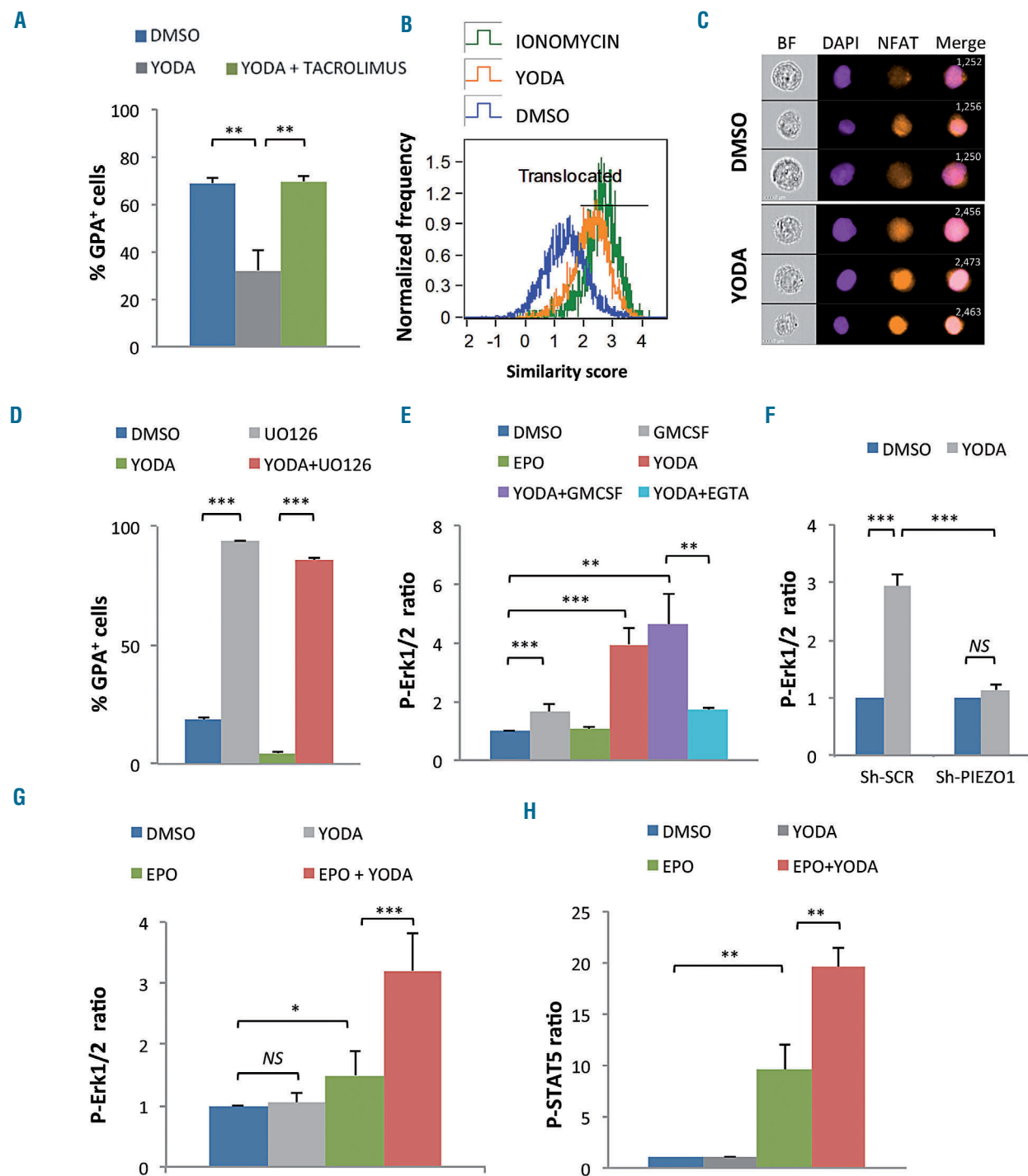


Figure 6. YODA1 activates NFAT, ERK and STAT5 pathways in erythroid cells. (A) The decrease in glycoprotein A (GPA) in UT7/EPO cells after exposure to 5 μ M YODA1 was blocked by concomitant exposure to 5 μ M tacrolimus (32 \pm 8% vs. 70 \pm 2.5%). (B) NFAT nuclear translocation secondary to exposure to 10 μ M YODA1, assessed on ImageStream[®]X by the similarity score (SS) value in UT7/EPO cells, after overnight starvation of serum and erythropoietin (EPO). The SS is a mathematical tool used in Amnis IDEAS[®] software to assess the co-localization of a fluorescent signal (NFATc1-PE) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) nuclear staining. A high SS value means a highly translocated state. (C) Images of NFATc1 cellular localization using live imaging flow cytometry. After exposure to dimethylsulfoxide (DMSO), NFATc1 was preferentially localized in the cytosol, whereas 10 μ M YODA1 increased NFATc1 nuclear translocation. Images were extracted from Amnis IDEAS[®] software for mean SS values of each condition. (D) In UT7/GM cells, 10 μ M UO126 induced high glycoprotein A (GPA) expression (94 \pm 0.2%) compared to that following exposure to DMSO (18 \pm 2%) in medium containing granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (GMCSF), and reverted the YODA1-mediated GPA repression when EPO was added (86 \pm 1%). Cells were incubated with UO126 for 30 min before stimulation with 5 μ M YODA1, then cultured for 72 h. (E) ERK phosphorylation assessed by PhosphoFlow in UT7/GM cells. Values shown are the p-ERK ratio relative to DMSO alone. GMCSF induced mild ERK phosphorylation (x1.65 \pm 0.27) whereas 10 U/mL EPO did not (x1.06 \pm 0.1, P =NS). YODA1 (10 μ M) induced strong ERK phosphorylation (x3.96 \pm 0.581), an effect that was markedly inhibited by 2 mM ethylene glycol tetra-acetic acid (EGTA) (x1.71 \pm 0.05). (F) ERK phosphorylation assessed by PhosphoFlow in UT7/EPO cells. Sh-RNA-mediated PIEZO1 knockdown inhibited the 10 μ M YODA1-induced ERK phosphorylation (fold P-ERK increase in Sh-SCR-transduced cells: x2.93 \pm 0.2; in Sh-PIEZO1-transduced cells: x1.13 \pm 0.1). (G) ERK phosphorylation assessed by PhosphoFlow in primary human CD34⁺-derived erythroid cells. YODA1 did not induce ERK phosphorylation (x1.04 \pm 0.16, P =NS), whereas 5 U/mL EPO did moderately (x1.49 \pm 0.4). YODA1 synergized with EPO to induce ERK phosphorylation (x3.21 \pm 0.62). (H) STAT5 phosphorylation assessed by PhosphoFlow in primary human CD34⁺-derived erythroid cells. Compared to DMSO, YODA1 did not induce STAT5 phosphorylation (x1.03 \pm 0.09, P =NS), whereas EPO did (x9.6 \pm 2.4), and YODA1 enhanced EPO-driven STAT5 phosphorylation (x19.6 \pm 1.9). (n=3 in A and D, and n=4 in all other experiments); *** P <0.001; ** P <0.01; * P <0.05

Figures S8 and S9. Cultures of cells from four patients could be driven beyond day 10 and showed progressive terminal maturation and enucleation, but at a heterogeneous rate, confirming that erythroid differentiation was delayed but not totally blocked (Online Supplementary Figure S10).

Discussion

The mechanotransducer PIEZO1 has a well-described role in regulating hydration and volume of mature erythrocytes.^{12,28} Indeed, activating mutations are responsible for most HX cases and, recently, a frequent polymorphism (E756del) has been associated with resistance to malaria in African populations,^{29,30} although its influence on red cell hydration status is still controversial.³¹ *PIEZO1* expression during erythropoiesis has been previously studied using RNA-sequencing analysis, the results of which were in agreement with our data that *PIEZO1* is expressed in early progenitors¹⁴ and decreases during terminal maturation.²³ These findings were confirmed at a protein level by extensive proteomic analyses of human erythroid differentiation.²⁴ Whether PIEZO1 has a specific role during erythropoiesis is not known, although evoked in recent case reports.^{19,32} Our data show for the first time that PIEZO1 is expressed and functional in erythroid progenitors, and that its activation influences erythroid differentiation, both in leukemic cell lines and primary erythroid cells. Indeed, PIEZO1 activation maintained cells at an immature GPA^{low} stage for longer and tilted the transcriptional balance in favor of genes associated with an immature stage, such as *GATA2* and *BMI1*, at the expense of genes associated with terminal differentiation, such as *GATA1*, *GPA*, *ALAS2* or α and β globin without myeloid bias.^{33,34} Of

note, we used the chemical activator YODA1 to evaluate the effects of PIEZO1 on erythropoiesis.²⁵ The phenotype was dependent on PIEZO1 since it was abrogated after Sh-RNA mediated *PIEZO1* knockdown, and was also confirmed in erythroid cells from HX patients carrying *PIEZO1* gain-of-function mutations. Interestingly, we observed that *PIEZO1* knockdown using a Sh-RNA strategy enhanced erythroid differentiation in UT7 cells. Since PIEZO1 activation was associated with an undifferentiated state in UT7 cells, we may assume that a low PIEZO1 level at the cell surface could lead to a lower “basal” activation rate and favor cell differentiation at the expense of cell proliferation. Of note, it was intriguing that a 50% reduction of PIEZO1 expression was sufficient to revert the YODA1-mediated effects. Although the GFP intensity determined the strength of YODA1 blockade, Sh-PIEZO1 significantly - but not totally - blocked the effects of YODA1 in GFP intermediate cells. This may argue for a threshold effect of PIEZO1, which could be further confirmed in patch-clamp experiments.

PIEZO1 is known as a non-selective cation channel.⁷ We showed that the effect of PIEZO1 activation on erythropoiesis was Ca²⁺-dependent, as described in mature red cells as well as in many other ‘PIEZO1-sensitive’ cells such as endothelial, urothelial, and epithelial cells.^{5,15-17} However, the consequences of a PIEZO1-mediated increase in intracellular Ca²⁺ may depend on the cell type. In mature red cells, the observed phenotype (i.e., red cell dehydration) occurs because of a secondary activation of the Gardos channel, which in turn exports K⁺ and induces loss of water.¹³ The effects of PIEZO1 on erythropoiesis seem not to occur through this pathway, since the Gardos inhibitor Senicapoc could not revert the phenotype. Ca²⁺ influx has previously been shown to be involved during erythropoiesis. Notably, it has been suggested that EPO

Table 1. Characteristics of the 14 patients, 11 families and 10 *PIEZO1* mutations, number of patients and family per mutation and main hematologic features.

Mutation Id	Patient n/ Family n	PIEZO1 mutation Exon cDNA Protein	Age	Hb (g/L)	MCV (fL)	Reticulocytes x10 ⁹ /L	Ferritin (µg/L)	MRI (µmol/g)	N. of experiments	Erythroid phenotype
HX#1	1/1	14 c.1792G>A p.Val598Met	43	144	107	404	828	190	N=3	High
HX#2	2/2	18 c.2344G>A c.2423G>A p.Gly782Ser p.Arg808Gln	55	142	101	441	613	95	N=3	High
HX#3	3/3 4/3	42 c.6058G>A* c.6058G>A* p.Ala2020Thr p.Ala2020Thr	31 61	146 174	85 91	173 293	30 980	NA 104	N=1 N=1	Mild/moderate Mild/moderate
HX#4	5/4	42 c.6007G>A c.7471C>T p.Ala2003Thr p.Arg2491Trp	24	118	99	451	86	NA	N=3	High
HX#5	6/5	51 c.7391A>C p.His2464Pro	36	181	87	205	71	NA	N=1	High
HX#6	7/6	16 c.2152G>A c.7463G>A# p.Gly718Ser p.Arg2488Gln	51	152	93	167	119	34	N=1	Mild/moderate
HX#7	8/7	51 c.7529C>T p.Pro2510Leu	43	112	83	183	NA	NA	N=1	High
HX#8	9/8	16 c.2042T>C p.Phe681Ser	44	145	102	248	86	15	N=1	High
HX#9	10/9	51 c.7367G>A* p.Arg2456His	63	112	120	288	535	200	N=2	High
HX#10	11/10 12/10 13/10	16 c.2005G>T c.2005G>T c.2005G>T p.Asp669Tyr p.Asp669Tyr p.Asp669Tyr	62 39 35	141 142 149	98 104 107	249 496 290	1000 889 507	330 NA 180	N=1 N=1 N=1	Mild/moderate Mild/moderate Mild/moderate
HX#11	14/11	51 c.7367G>A* p.Arg2456His	78	129	85	221	600	NA	N=1	High

*Functional studies showing slower PIEZO1 inactivation kinetics.^{8,12} #: Functional studies showing a lower PIEZO1 activation threshold.⁶ Ferritin assays and magnetic resonance imaging evaluation of iron liver content were performed at diagnosis or before iron chelation/phlebotomy. Patients HX#9 and HX#11, from two different families, had the same *PIEZO1* mutation. Id: identity; Hb: hemoglobin; MCV: mean corpuscular volume; MRI: magnetic resonance imaging.

could indirectly regulate Ca^{2+} currents by modulating Ca^{2+} -channel expression at the cell surface.^{35,36} However, consequences on erythroid maturation remain largely unknown. Ca^{2+} signaling is required during enucleation in mice,³⁷ but we did not observe any effect on enucleation rate when PIEZO1 was activated in the last step of differentiation (*data not shown*). In contrast, we did observe that Ca^{2+} influx through PIEZO1 had an early effect on erythro-

poiesis and noticed that NFAT, ERK1/2 and STAT5 were activated by PIEZO1-dependent Ca^{2+} entry in erythroid cells. In particular, we found that ERK was strongly phosphorylated by YODA1. ERK phosphorylation was inhibited after *PIEZO1* knockdown, a result contrasting with a recent study showing that YODA1 phosphorylated ERK in endothelial cells in a PIEZO1-independent manner.³⁸ However, this observation was made using chemical

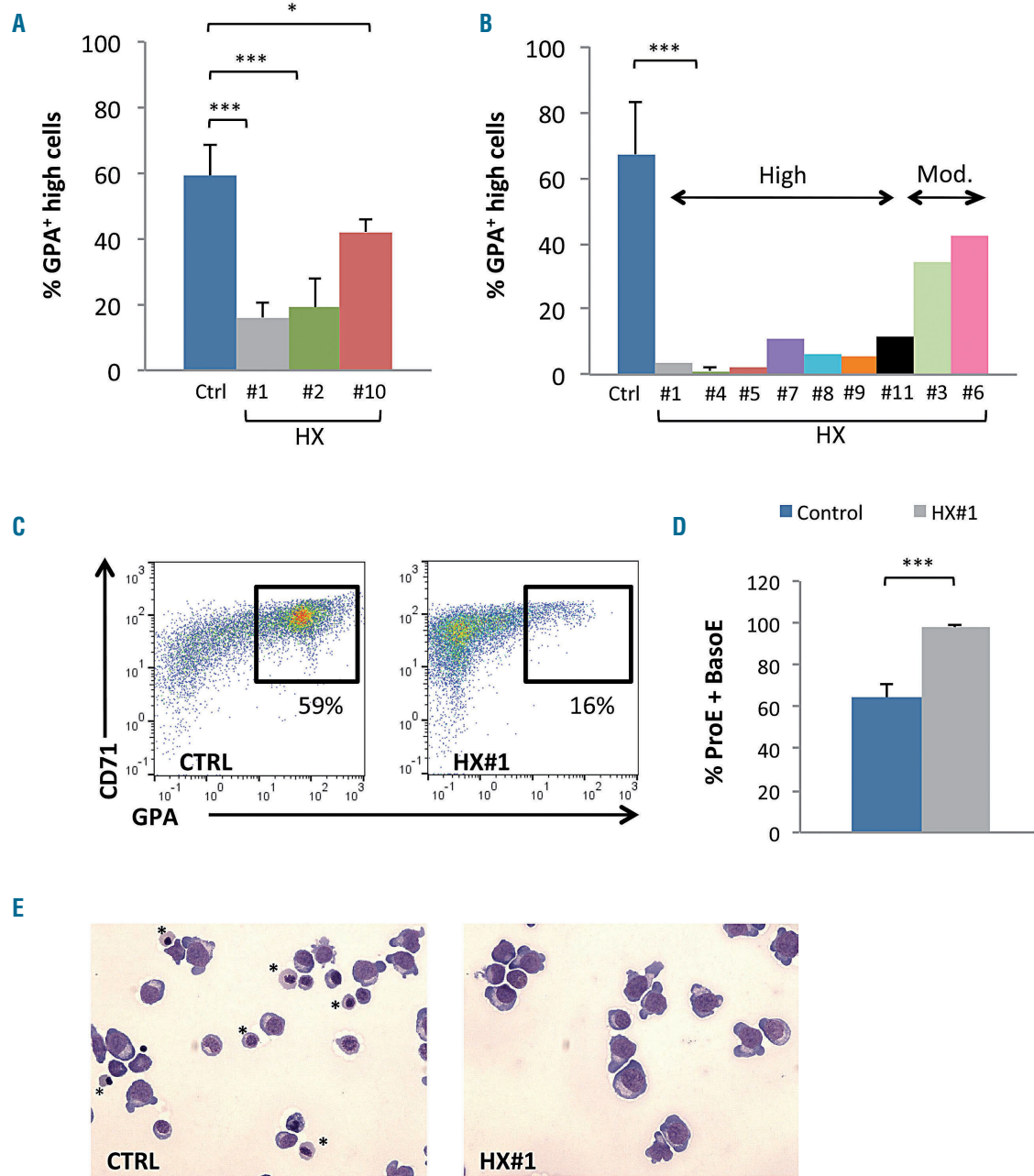


Figure 7. Delay in erythroid differentiation of progenitor cells obtained from patients with *PIEZO1*-mutated hereditary xerocytosis. (A) Culture of CD34⁺-derived erythroid cells from patients with hereditary xerocytosis (HX); differentiation was assessed at day 10 by multiparametric flow cytometry (MFC). The mean percentage of CD71⁺/GPA^{high} cells was 59±9% in control samples, 16±5% in HX#1 ($P<0.001$), 19±9% in HX#2 ($P<0.01$), and 42±4% in HX#10 ($P<0.05$). ($n=5$ for control samples; $n=3$ for HX#1, 2 and 10). (B) Culture of mononuclear cells from HX patients; differentiation assessed on day 10 by MFC ($n=9$ for control samples; $n=3$ for HX#4; $n=1$ for HX#1-11). The mean percentage of CD71⁺/GPA^{high} cells was 71±17% in the control group, and ranged from 0.3% to 11.7% in the “high delay” group and from 22.5% to 44% in the “moderate delay” group. (C) Illustrative CD71/GPA MFC plots at day 10 of erythroid differentiation of CD34⁺ cells obtained from patient HX#1 (right) and from one representative control sample (left). (D) Cytological analysis after staining with May-Grünwald-Giemsa (MGG): count of immature erythroblasts [proerythroblasts (ProE) and basophilic erythroblasts (BasoE)] on day 10, x200 magnification. Immature erythroblasts were 64.2±6.2% in control samples vs. 97.7±1.5% in HX#1 ($n=6$ control samples; $n=3$ for patient HX#1). (E) Example of cytology on day 10 for patient HX#1 (right) and for a control sample (left), MGG staining, x200 magnification. *show orthochromatic erythroblasts. *** $P<0.001$; ** $P<0.01$; * $P<0.05$.

PIEZO1 inhibitors, which are much less specific than a Sh-RNA based strategy. The PIEZO1-Ca²⁺-ERK axis has been described in epithelial cells, in which it regulated the cell cycle and survival.¹⁵ Whether Ca²⁺ entry into erythroblasts through PIEZO1 was sufficient to activate the ERK pathway by itself or whether it triggered secondary pathways is under investigation. ERK1/2 activation has been shown to promote early human progenitor cell expansion and its constitutive activation in mice blocked differentiation of fetal liver erythroid progenitor cells.³⁹⁻⁴¹ Alternatively, ERK activation through EPO has been shown to promote erythroid differentiation in a MASL1-dependent manner.⁴² This discrepancy in the role of ERK1/2 in erythroid differentiation may depend on its activation level. Our results showed that PIEZO1 activation synergized both EPO-dependent ERK and STAT5 phosphorylation in primary erythroblasts, suggesting that PIEZO1 may act as a modulator of EPO signaling during human erythropoiesis. Previous data suggested that erythroid regulation involved balanced STAT5 and ERK1/2 phosphorylation, and we assume that PIEZO1 may modify this equilibrium to delay erythroid terminal differentiation.⁴³ Of note, YODA1-sustained ERK1/2 activation in UT7/GM cells did not promote cell proliferation, in contrast to other cell types, but instead led to accumulation in the G0/G1 phase of the cell cycle.^{41,44} This may be due to the fact that YODA1 phosphorylated ERK1/2 but not STAT5 in UT7/GM cells in which proliferation was mainly dependent on STAT5. Alternatively, PIEZO1 activation could modulate cell cycle regulators as previously shown in canine epithelial cells.⁶ This highlights the heterogeneous role of PIEZO1 activation, which differs depending on the type of cell. We also showed that the effects of YODA1 required NFAT activation and nuclear translocation, which have been involved in mice erythropoiesis.⁴⁵ Whether this pathway also depends on EPO signaling is under investigation.

Erythroid cells from HX patients carrying *PIEZO1* gain-of-function mutations had a similar phenotype as the one observed after PIEZO1 chemical activation. This highlights the pathophysiological relevance of this ion channel, proving that how PIEZO1 is activated (i.e., constitutive mutation vs. chemical activation) is not critical. Moreover, it suggests that the HX erythroid phenotype may involve a certain degree of impaired erythropoiesis, as evoked in two recent case reports, which may participate in the high

rate of iron overload described in these patients.^{8,19,22,32} However, the delay in erythroid differentiation does not translate into anemia since most patients have a totally compensated hemolysis. First, dyserythropoiesis may be mild *in vivo*. Second, it has been suggested that *PIEZO1*-HX red blood cells have an increased hemoglobin affinity for oxygen.⁴⁶ Therefore, hemoglobin level could represent a balance between factors that tend to decrease it (hemolysis, dyserythropoiesis) and factors that tend to increase it (hemoglobin hyperaffinity). We were unable to find a clear correlation between *in vivo* erythrocyte parameters in HX patients and the *in vitro* erythroid phenotype. This may be due to different mechanisms involved, since mature red cell dehydration is known to be Gardos-dependent while the YODA1-induced erythroid delay was insensitive to Senicapoc. However, it would be of great interest to correlate, for each mutation, the intensity of the erythroid phenotype with functional tests such as high-throughput patch clamping on red cells.⁴⁷ Alternatively, modeling the different HX mutations through viral transduction in normal erythroid progenitors would represent an interesting way to better understand the disease heterogeneity and to highlight the potential role of other genetic factors that may modulate the phenotype.

In summary, we describe here a role for PIEZO1 during human erythroid differentiation, in erythroleukemic cell lines, in normal primary erythroblasts after exposure to YODA1, and in primary cells from HX patients carrying an activating *PIEZO1* mutation. We observed a delay in terminal erythroid maturation which depended on Ca²⁺ entry, and NFAT, STAT5 and ERK1/2 pathway activation. We observed that PIEZO1 could synergize with EPO-signaling during human erythropoiesis and that its constitutive activation in HX led to impairment in proliferation and differentiation of erythroid progenitors, highlighting a new pathophysiological mechanism in this rare disorder.

Acknowledgments

The authors are grateful to the University Hospital of Amiens (CHU Amiens), the Club du Globule Rouge et du Fer (CGRF), and the Réseau Hématologie Picardie (RHEPI) for their support. CHU Amiens provided financial support through the HEMAS-TEM project. We thank Prof. Stephane Giraudier (Paris, France) for the MEK-DN plasmid.

References

- Coste B, Mathur J, Schmidt M, et al. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science*. 2010;330(6000):55-60.
- Saotome K, Murthy SE, Kefauver JM, Whitwam T, Patapoutian A, Ward AB. Structure of the mechanically activated ion channel Piezo1. *Nature*. 2018;554(7693):481-486.
- Zhao Q, Zhou H, Chi S, et al. Structure and mechanogating mechanism of the Piezo1 channel. *Nature*. 2018;554(7693):487-492.
- Cinar E, Zhou S, DeCoursey J, Wang Y, Waugh RE, Wan J. Piezo1 regulates mechanotransductive release of ATP from human RBCs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(38):11783-11788.
- Cahalan SM, Lukacs V, Ranade SS, Chien S, Bandell M, Patapoutian A. Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume. *Elife*. 2015;4.
- Wu J, Young M, Lewis AH, Martfeld AN, Kalmeta B, Grand J. Inactivation of mechanically activated Piezo1 ion channels is determined by the C-terminal extracellular domain and the inner pore helix. *Cell Rep*. 2017;21(9):2357-2366.
- Gnanasambandam R, Bae C, Gottlieb PA, Sachs F. Ionic selectivity and permeation properties of human PIEZO1 channels. *PLoS One*. 2015;10(5):e0125503.
- Andolfo I, Alper SL, De Franceschi L, et al. Multiple clinical forms of dehydrated hereditary stomatocytosis arise from mutations in PIEZO1. *Blood*. 2013;121(19):3925-3935.
- Zarychanski R, Schulz VP, Houston BL, et al. Mutations in the mechanotransduction protein PIEZO1 are associated with hereditary xerocytosis. *Blood*. 2012;120(9):1908-1915.
- Albuisson J, Murthy SE, Bandell M, et al. Dehydrated hereditary stomatocytosis linked to gain-of-function mutations in mechanically activated PIEZO1 ion channels. *Nat Commun*. 2013;4:1884.
- Bae C, Gnanasambandam R, Nicolai C, Sachs F, Gottlieb PA. Xerocytosis is caused by mutations that alter the kinetics of the mechanosensitive channel PIEZO1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(12):E1162-1168.

12. Glogowska E, Schneider ER, Maksimova Y, et al. Novel mechanisms of PIEZO1 dysfunction in hereditary xerocytosis. *Blood*. 2017;130(16):1845-1856.
13. Rapetti-Mauss R, Picard V, Guitton C, et al. Red blood cell Gardos channel (KCNN4): the essential determinant of erythrocyte dehydration in hereditary xerocytosis. *Haematologica*. 2017;102(10):e415-e418.
14. Li J, Hale J, Bhagia P, et al. Isolation and transcriptome analyses of human erythroid progenitors: BFU-E and CFU-E. *Blood*. 2014;124(24):3636-3645.
15. Gudipaty SA, Lindblom J, Loftus PD, et al. Mechanical stretch triggers rapid epithelial cell division through Piezo1. *Nature*. 2017;543(7643):118-121.
16. Miyamoto T, Mochizuki T, Nakagomi H, et al. Functional role for Piezo1 in stretch-evoked Ca²⁺ influx and ATP release in urothelial cell cultures. *J Biol Chem*. 2014;289(23):16565-16575.
17. Li J, Hou B, Tumova S, et al. Piezo1 integration of vascular architecture with physiological force. *Nature*. 2014;515(7526):279-282.
18. Del Marmol JI, Touhara KK, Croft G, MacKinnon R. Piezo1 forms a slowly-inactivating mechanosensory channel in mouse embryonic stem cells. *Elife*. 2018;7.
19. Park J, Jang W, Han E, et al. Hereditary dehydrated stomatocytosis with splicing site mutation of PIEZO1 mimicking myelodysplastic syndrome diagnosed by targeted next-generation sequencing. *Pediatr Blood Cancer*. 2018;65(7):e27053.
20. Garçon L, Lacout C, Svinartchouk F, et al. Gfi-1B plays a critical role in terminal differentiation of normal and transformed erythroid progenitor cells. *Blood*. 2005;105(4):1448-1455.
21. Walrafen P, Verdier F, Kadri Z, Chrétien S, Lacombe C, Mayeux P. Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood*. 2005;105(2):600-608.
22. Picard V, Guitton C, Thuret I, et al. Clinical and biological features in PIEZO1-hereditary xerocytosis and Gardos-channelopathy: a retrospective series of 126 patients. *Haematologica*. 2019;104(8):1554-1564.
23. An X, Schulz VP, Li J, et al. Global transcriptome analyses of human and murine terminal erythroid differentiation. *Blood*. 2014;123(22):3466-3477.
24. Gautier E-F, Ducamp S, Leduc M, et al. Comprehensive proteomic analysis of human erythropoiesis. *Cell Rep*. 2016;16(5):1470-1484.
25. Syeda R, Xu J, Dubin AE, et al. Chemical activation of the mechanotransduction channel Piezo1. *Elife*. 2015;4.
26. Hu J, Liu J, Xue F, et al. Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. *Blood*. 2013;121(16):3246-3253.
27. Hogan PG. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev*. 2003;17(18):2205-2232.
28. Gallagher PG. Disorders of erythrocyte hydration. *Blood*. 2017;130(25):2699-2708.
29. Caulier A, Rapetti-Mauss R, Guizouarn H, Picard V, Garçon L, Badens C. Primary red cell hydration disorders: pathogenesis and diagnosis. *Int J Lab Hematol*. 2018;40 (Suppl 1):68-73.
30. Ma S, Cahalan S, LaMonte G, et al. Common PIEZO1 allele in African populations causes RBC dehydration and attenuates Plasmodium infection. *Cell*. 2018;173(2):443-455.e12.
31. Rooks H, Brewin J, Gardner K, et al. A gain of function variant in PIEZO1 (E756del) and sickle cell disease. *Haematologica*. 2019;104(3):e91-e93.
32. Paessler M, Hartung H. Dehydrated hereditary stomatocytosis masquerading as MDS. *Blood*. 2015;125(11):1841.
33. Moriguchi T, Yamamoto M. A regulatory network governing Gata1 and Gata2 gene transcription orchestrates erythroid lineage differentiation. *Int J Hematol*. 2014;100(5):417-424.
34. Hattangadi SM, Wong P, Zhang L, Flygare J, Lodish HF. From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. *Blood*. 2011;118(24):6258-6268.
35. Cheung JY, Zhang XQ, Bokvist K, Tillotson DL, Miller BA. Modulation of calcium channels in human erythroblasts by erythropoietin. *Blood*. 1997;89(1):92-100.
36. Chu X, Cheung JY, Barber DL, et al. Erythropoietin modulates calcium influx through TRPC2. *J Biol Chem*. 2002;277(37):34375-34382.
37. Wöhlwer CB, Pase LB, Russell SM, Humbert PO. Calcium signaling is required for erythroid enucleation. *PLoS ONE*. 2016;11(1):e0146201.
38. Dela Paz NG, Frangos JA. Yoda1-induced phosphorylation of Akt and ERK1/2 does not require Piezo1 activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;497(1):220-225.
39. 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(4):1142-1149.
40. Zhang J, Socolovsky M, Gross AW, Lodish HF. Role of Ras signaling in erythroid differentiation of mouse fetal liver cells: functional analysis by a flow cytometry-based novel culture system. *Blood*. 2003;102(12):3938-3946.
41. Zhang J, Lodish HF. Constitutive activation of the MEK/ERK pathway mediates all effects of oncogenic H-ras expression in primary erythroid progenitors. *Blood*. 2004;104(6):1679-1687.
42. Kumkhaek C, Aerbajinai W, Liu W, et al. MASL1 induces erythroid differentiation in human erythropoietin-dependent CD34+ cells through the Raf/MEK/ERK pathway. *Blood*. 2013;121(16):3216-3227.
43. Arcasoy MO, Jiang X. Co-operative signalling mechanisms required for erythroid precursor expansion in response to erythropoietin and stem cell factor. *Br J Haematol*. 2005;130(1):121-129.
44. Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 1995;80(2):179-185.
45. Giampaolo S, Wójcik G, Klein-Hessling S, Serfling E, Patra AK. NFAT-mediated defects in erythropoiesis cause anemia in *Il2*^{-/-} mice. *Oncotarget*. 2018;9(11):9632-9644.
46. Kiger L, Guitton C, Ghazal K, et al. Physiopathology of hereditary xerocytosis: Piezo gain of function mutations impact hemoglobin oxygen. *Haematologica*. 2017;102(s2):446.
47. Rotordam GM, Fermo E, Becker N, et al. A novel gain-of-function mutation of Piezo1 is functionally affirmed in red blood cells by high-throughput patch clamp. *Haematologica*. 2019;104(5):e179-e183.