



HAL
open science

Mécanismes de régulation de GATA-1 par les protéines de choc thermique Hsp27 et Hsp70 au cours de la différenciation érythroïde terminale.

Julie Vandekerckhove

► **To cite this version:**

Julie Vandekerckhove. Mécanismes de régulation de GATA-1 par les protéines de choc thermique Hsp27 et Hsp70 au cours de la différenciation érythroïde terminale.. Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2009. Français. NNT: . tel-00432780

HAL Id: tel-00432780

<https://theses.hal.science/tel-00432780>

Submitted on 17 Nov 2009

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.

UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS SUD

Année 2009-2010

N° attribué par la bibliothèque

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Champ disciplinaire : biochimie, biologie cellulaire et moléculaire

Ecole Doctorale de rattachement : Cancérologie, Biologie, Médecine, Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Julie **VANDEKERCKHOVE**

le 12 novembre 2009

**Mécanismes de régulation de GATA-1
par les protéines de choc thermique Hsp27 et Hsp70
au cours de la différenciation érythroïde terminale.**

Directeur de thèse : Professeur Olivier HERMINE

Jury :

Président : Professeur William Vainchenker

Rapporteur : Docteur François Morlé

Rapporteur : Docteur Patrice Dubreuil

Examineur : Docteur Stany Chrétien

Résumé

L'érythropoïèse est le processus permettant la production de globules rouges matures partir de cellules souches hématopoïétiques. Ce programme de différenciation est en grande partie sous le contrôle du facteur de transcription GATA-1 qui active la transcription des gènes érythroïdes et de la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L. Au cours de l'apoptose, la caspase-3 clive GATA-1 induisant la diminution d'expression de Bcl-x_L. Il a été montré que l'activation transitoire de la caspase-3 est indispensable pour la différenciation érythroïde terminale, mais GATA-1 n'est pas clivé. Dans ce travail, nous montrons qu'à la différence du processus apoptotique induit par la privation en Epo, au cours de la différenciation érythroïde, GATA-1 est protégé du clivage de la caspase-3 par la protéine chaperonne Hsp70. Au moment de l'activation de la caspase-3, Hsp70 s'accumule dans le noyau des érythroblastes et protège GATA-1, permettant ainsi l'expression de Bcl-x_L. Par contre, lors de la privation en Epo, Hsp70 est exportée du noyau et GATA-1 est clivé par la caspase-3 ce qui induit l'apoptose. D'autre part, la surexpression de GATA-1 induit un blocage de la maturation donc, l'expression de GATA-1 doit être finement régulée pour permettre une différenciation érythroïde normale. Nous avons montré qu'Hsp27 s'accumule dans le noyau des érythroblastes en cours de différenciation sous l'action de la phosphorylation de la MAPK p38. Hsp27 nucléaire interagit avec la forme acétylée de GATA-1 et induit son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome. Ces résultats montrent un nouveau rôle d'Hsp70 et Hsp27 au cours de la différenciation érythroïde terminale en intervenant dans des mécanismes de régulation fine de l'expression de GATA-1.

Nous avons déterminé les mécanismes par lesquels Hsp70 est accumulé dans le noyau des érythroblastes au cours de la différenciation érythroïde terminale. L'érythropoïèse est régulée positivement par deux facteurs indispensables à la prolifération et la survie des progéniteurs érythroïdes, le SCF pour les phases précoces jusqu'au stade d'érythroblaste basophile et l'Epo à partir des CFU-E jusqu'au stade d'érythroblastes. Avant la diminution d'expression de c-Kit, le récepteur au SCF, au stade d'érythroblastes basophiles, Hsp70 est principalement cytoplasmique. En effet, le SCF induit l'export nucléaire d'Hsp70 par la phosphorylation induite par AKT sur la sérine 400 résultant en une faible quantité d'Hsp70 nucléaire. Au stade de la diminution d'expression de c-Kit, l'export nucléaire induit par le SCF est diminué. D'autre part, l'Epo, en activant Lyn, induit la rétention nucléaire d'Hsp70. Nous décrivons donc un nouveau mécanisme du retard de la différenciation érythroïde par c-Kit puisque sa diminution est nécessaire pour que GATA-1 soit protégé du clivage de la caspase-3 par Hsp70 nucléaire. De plus, nous suggérons un nouveau mécanisme de Lyn dans la survie et la différenciation des érythroblastes sous Epo.

Nous avons testé notre modèle au cours de syndromes myélodysplasiques (SMD) de bas grade, caractérisés par une anémie associée à un excès d'activation des caspases et de l'apoptose ainsi qu'un retard de différenciation des progéniteurs érythroïdes. Nous avons démontré qu'un défaut de localisation nucléaire d'Hsp70 est en partie responsable du phénotype observé puisque l'expression d'Hsp70 nucléaire restaure en partie le phénotype des progéniteurs érythroïdes de patients atteints de SMD. Ces résultats concordent avec notre modèle physiologique. De plus, il est envisageable que c-Kit pourrait être une nouvelle cible thérapeutique pour les patients atteints de SMD.

Mots clé : Hsp70, Hsp27, GATA-1, érythropoïèse, SMD.

Abstract

Erythropoiesis is a process leading to red cells production. This differentiation program is mainly under control of the transcription factor GATA-1 that controls the expression of erythroid genes and the anti-apoptotic protein Bcl-x_L. During apoptosis, GATA-1 is cleaved by activated caspase-3, leading to decreased Bcl-x_L expression. During terminal erythroid differentiation, transient caspase-3 activation is required but GATA-1 remains uncleaved. In this study we demonstrated that during differentiation but not during apoptosis, the chaperone protein Hsp70 protects GATA-1 from caspase 3-mediated proteolysis. At the onset of caspase activation, Hsp70 translocates into nucleus and protects GATA-1, allowing Bcl-x_L. In contrast, EPO starvation induces the nuclear export of Hsp70 and the cleavage of GATA-1 leading to apoptosis. On the other hand, GATA-1 overexpression induces a blocage of maturation, then GATA-1 expression must be tightly regulated for proper erythroid differentiation. Here, we showed that Hsp27 is accumulated into nucleus of differentiating erythroblasts through p38 MAPPK phosphorylation. Nuclear Hsp27 interacts with acetylated GATA-1 to favor its ubiquitinylation and proteasomal degradation. Those results show a new role for Hsp70 and Hsp27 along terminal erythroid differentiation through the fine tuning of GATA-1 expression.

Further, we determined the mechanisms of nuclear accumulation during terminal erythroid differentiation. Erythropoiesis is positively regulated by two factors necessary for proliferation and survival of erythroid progenitors, SCF from early stage until the stage of basophilic erythroblast and Epo since CFU-E until erythroblast. Before c-Kit (SCF receptor) down-modulation at basophilic stage, Hsp70 is mainly localized into cytoplasm. Indeed, SCF induced Hsp70 nuclear export via S400 Hsp70 AKT phosphorylation resulting in a weak nuclear Hsp70. At the onset of c-Kit down-modulation, SCF induced Hsp70 nuclear export was decreased. On the other hand, Epo activated Lyn induced Hsp70 nuclear accumulation. Then, we described here a new mechanism of c-Kit erythroid blocage since its down modulation is necessary for caspase-3 GATA-1 protection by Hsp70. Moreover, we highlighted a new survival and differentiating role for Lyn kinase under Epo.

We tested if our model could be applied to low grade myelodysplastic syndrome (MDS), characterized by anemia, associated with excessive caspase activation leading to apoptosis and delayed expression of the glycophorin A marker of erythroid progenitors. Here, we demonstrated that a defect in nuclear localization of Hsp70 is partially responsible for the observed phenotype since expression of nuclear Hsp70 partially rescues phenotype observed in differentiating cells of MDS patients. These results confirm our physiologic model. Moreover, c-Kit could be a new therapeutic target in MDS.

Key words : Hsp70, Hsp27, GATA-1, erythropoiesis, SMD.

Remerciements

Le premier à avoir cru (avant moi d'ailleurs) que je serais capable de me lancer dans cette aventure a été Mirdad. Merci d'y avoir cru et d'en faire part à Olivier.

Je remercie Michel Dy de m'avoir accueillie au sein de son unité, merci pour l'Amaxa. Je remercie aussi son équipe de choc, Catherine et Fabienne, et aussi Madame Manhard, toujours là pour nous aider, nous sauver des comptes et décomptes faramineux .

Merci à Olivier, rencontré dans un pays lointain à côté des tortues marines. Pensée spéciale à la première fois que j'ai entendu les mots caspases et érythropoïèse (érythroquoi ????) à Cacao, il chuchotait dans le brouhaha de la voiture qui roulait sur la piste, je comprenais un mot sur deux..... Merci de m'avoir fait confiance aveuglément, de m'avoir donné cette chance d'accomplir un rêve. Tu m'as appris à me poser des questions simples, qu'il faut toujours continuer, même quand on a envie de tout laisser derrière soi. J'ai apprécié la liberté que tu nous laisses, même si parfois, j'avais besoin d'un peu de réconfort, de conseils, car en quelques minutes tu as le pouvoir de redonner confiance. Bon, je n'ai pas toujours suivi toutes tes théories, mais il faut dire qu'avec tes 5 idées à la seconde, j'aurais eu besoin de 48h par jour. Et puis, c'est vrai, j'ai aussi consacré du temps à ma vie perso et je te remercie d'avoir toléré et respecté ce choix.

Je remercie les membres de mon jury d'avoir consacré leur temps précieux à ce travail. Un grand merci à Patrick, Carmen, Patrice et Michaëla pour leur support scientifique et leurs idées.

Cette thèse fut un travail d'équipe, avec la « home team ». Machuss et Anoa, merci à vous deux de m'avoir donné le cap quand je perdais le nord, d'avoir soufflé dans mes voiles par temps de grand calme. Cette traversée au long cours nous portera aux abords de la côte, c'est promis.

Ah !!!! au quotidien, mes collègues et amis, Amédée, Séverine, Michaël, Pascaline, Céline, Pierre, Seb, Anne Sô, Dani, Luiza.... toujours là pour discuter scientifique ou...un peu moins, boire un (des) coup(s) autour d'un paquet de chips, raconter des âneries pour

oublier, se conseiller, se remonter le moral lors du flou artistique de la thèse, gérer les corvées quotidiennes du labo.

Spéciale dédicace à Amédée et Cécile, tonton et tata, voisin et voisine, ami et amie. Merci pour vos gâteaux, discussions révolutionnaires et/ou visionnaires. Merci AMD, seul homme parmi une marée de nanas, d'avoir supporté... tous les jours... nos discussions de femmes enceintes, de femmes, de mamans.....

Sév et Poupée, merci pour votre présence, votre amitié, vos conseils. Vous avez rendu mes journées de travail légères et drôles, c'était un plaisir de venir au labo car je savais que j'allais y trouver mes copines, et un max de délires.

Céline, ce fut un honneur de partager avec toi discussions sérieuses mais aussi et surtout ces quelques nuits au loin, dans le même lit parfois, ces soirées endiablées et les vieux restes du buffet du CHO.

Michael, qu'aurait-on fait sans toi au cours de cette aventure ?..... Toujours le mot qui fait plaisir, le sourire au max de sa puissance.... Que demander de plus.... On peut se voir plus souvent ?

Peter, j'ai appris à connaître le mec entier et sincère qui se cache derrière cet air sérieux et discret. Bon ok, quand t'es trop sérieux ou trop fatigué du we, tu arrives encore à me faire flipper... j'essaie un peu de te faire rire avec une connerie ou 2... puis j'arrête, ok, faut pas aller plus loin.

Remarqué et remarquable Seb, toujours là pour comprendre mon côté belge, hein voisin !! Maintenant je sais que derrière ce fort caractère se cache un ourson.

Anne Sô, pourquoi t'es pas arrivée plus tôt dans ce labo ??????!!!!!! Au-delà d'une chercheuse talentueuse, j'ai rencontré une nana posée, avec qui j'ai énormément apprécié ces échanges psycho-philosophe-littéralo-sympas.

Un grand merci à Joëlle, tu as toujours été là pour protéger ta couvée, nous lancer, nous supporter, nous encourager, nous aider. Tu as un peu été mon ange gardien pendant ces 5 années.

Ce fut un plaisir de partager le bureau avec Sophie et Geneviève avec qui nous avons échangé de loooooongues discussions.

Merci aussi à Ivan, ce fut parfois houleux avec toi, mais franc. Merci pour tes conseils scientifiques.

Merci à Yaël et Jar d'avoir tracé une belle piste que j'ai suivie avec plaisir.

Je remercie l'équipe de Patrick et particulièrement Frédérique pour leur accueil à Cochin.

Je remercie particulièrement Aurélie et Emilie, mes co-équipières avec qui ce fut un plaisir de pondre les papiers.

Clin d'œil amical à tous les voisins du couloir CNRS et INSERM, un grand merci à Dom et Nadia ainsi que leurs collègues.

Je remercie aussi mes parents et les co, qui ont respecté mes choix, même s'ils ne les comprenaient pas toujours. Merci pour votre soutien moral et financier parfois, d'avoir cru en moi et en Machuss aussi.

Ils ne liront sans doute jamais ces lignes mais ils font parties de mon quotidien de mon histoire alors merci à Muriel et Pépé, Amélie et Momo, Sév et Greg. Ils sont loin mais si proches, mes potes belges, Phil, Malo, Maggio et Sandra, Mato et Marilou, Mabeu, Marreau et Lucie, Sandrine et Axel. Je n'oublie pas les amis rencontrés en Guyane avec qui des liens fraternels se sont tissés: Julius et Meul, Guillaume et Elo, Bruno et Josée et puis Pascale et Fernand.

Sans vous tous, je ne serais pas là. Merci de m'avoir conduite jusqu'ici car j'y suis carrément bien.

Liste des abbreviations

ABD :	<i>ATPase binding domain</i>
AIF :	<i>Apoptosis Inducing Factor</i>
AP1 :	<i>activator protein-1</i>
Bcl6 :	<i>B-cell leukemia/lymphoma 6</i>
Bcl-X _L :	<i>B cell lymphoma-X_L</i>
BFU-E :	<i>burst forming unit-erythroid</i>
BTG1 :	<i>B cell translocation gene 1</i>
BTK :	<i>Bruton's tyrosine kinase</i>
CAD :	<i>caspase activated DNase</i>
CBP :	<i>CREB binding protein</i>
CD34 :	<i>Cluster designation 34 et Cluster designation 36</i>
Cdk :	<i>cyclin-dependant kinase</i>
c-FLIP :	<i>cellular FLICE-inhibitory protein</i>
CFU-Bas :	<i>colony-forming unit-basophil</i>
CFU-E :	<i>colony-forming unit-erythroid</i>
CFU-Eo :	<i>colony-forming unit-eosinophil</i>
CFU-G :	<i>colony-forming unit-granulocyte</i>
CFU-GEMM :	<i>colony-forming unit-granulocyte erythroid macrophage mixed</i>
CFU-GM :	<i>colony-forming unit-granulocyte-macrophage</i>
CFU-M :	<i>colony-forming unit-macrophage</i>
CFU-MK :	<i>colony-forming unit-megakaryocyte</i>
CHIP :	<i>C-terminus of HSC70-interacting protein</i>
CIS :	<i>cytokine-induced SH2 containing protein</i>
DR :	<i>Dead Receptor</i>
DISC :	<i>death-inducing signalling complex</i>
EEC :	<i>endogenous erythroid colonies</i>
Egr1 :	<i>early growth response 1</i>

EKLF : *erythroid Krüppel-like factor*
 Epo : *érythropoïétine*
 Erk1/2 : *extracellular-regulated kinases 1/2*
 Erk : *extracellular signal signal-regulated kinase*

FOG-1 : *Friend of GATA-1*
 Foxo3a : *forkhead box O3A*

GIST : *gastrointestinal stromal tumor*
 GM-CSF : *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
 GPA : *glycophorine A*
 GPS2 : *Group-based Prediction System 2*
 GSK3 : *glycogen synthetase kinase-3*
 Gspt1 : *G1 to S phase transition 1*

Hsp: *heat shock protein*
 HIF-1 : *Hypoxia Inducible Factor-1*

IAPs : *Inhibitory Apoptotic proteins*
 IGF-1 : *insulin-like growth factor-1*
 IL-3 : *interleukine-3*
 IPPS *International Pronostic Score System*

Jnk : *Jun kinase*

LAM : *leucémie aigue myéloïde*
 LMO2 : *Lim-domain partner of TAL1*
 Lyn : *Lck/Yes-related novel tyrosine kinase*

MAPK : *mitogen activated protein kinase*
 Mek : *MAPK/Erk kinase*
 MFI : *myélofibrose idiopathique*

Nab2 :	<i>Ngfi-A binding protein 2</i>
NE:	<i>nuclear enveloppe</i>
NGF :	<i>nerve growth factor</i>
NLS :	<i>nuclear localization sequence</i>
NPC :	<i>nuclear pore complex</i>
Nupr1 :	<i>nuclear protein 1</i>
PBD :	<i>peptide binding domain</i>
PDGF :	<i>platelet –derived growth factor</i>
PI-3K :	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PIP ₃ :	<i>3'-phopshorylated inositol lipid</i>
PKC :	<i>protein kinase C</i>
PLC :	<i>phospholipase C</i>
PV :	Polycythaemia vera
PTP-1B :	<i>protein tyrosine phosphatase 1B</i>
RB :	<i>Retinoblastoma protein</i>
REpo :	récepteur à l'érythropoïétine
SAPK :	<i>SAP kinase</i>
SCF :	<i>Stem Cell Factor</i>
SHIP :	<i>SH2-containing inositol phosphatase</i>
Smac :	<i>Second Mitochondria Derived Activator of Caspase</i>
SMD :	syndrome myélodysplasique
SOCS :	<i>suppressors of cytokine signalling</i>
STAT5 :	<i>signal transducer and activator of transcription 5</i>
TBid :	<i>truncated Bid</i>
TE :	thrombocytémie essentielle
TNF-R :	<i>tumor necrosis factor receptor death-inducing signalling complex DISC</i>
TPO :	thrombopoïétine
VHL :	von Hippel-Lindau

Liste des figures

Figure 1 Photos de CFU-E et BFU-E	13
Figure 2 schéma de l'hématopoïèse	14
Figure 3 Différentes protéines exprimées au cours de l'érythropoïèse	16
Figure 4 Structure en trois dimensions (3D) de GATA-1.	18
Figure 5 Représentation schématique de la protéine GATA-1.	23
Figure 6 Mutations dans le domaine N-terminal de GATA-1 causant des maladies chez l'homme.	24
Figure 7 Représentation schématique du récepteur c-Kit.	29
Figure 8 Résumé des voies de signalisation activées par c-Kit en réponse au SCF.	30
Figure 9 Voies de signalisation induites par le REpo en réponse à l'Epo.	34
Figure 10 L'axe « JAK2 only »	35
Figure 11 Représentation schématique de la protéine JAK2	36
Figure 12 Représentation schématique de la voie de transduction PI3-K/AKT	40
Figure 13 Schéma représentant la coopération entre c-Kit et REpo pour la prolifération des proérythroblastes en réponse au SCF et à l'Epo.	45
Figure 14 Régulation endocrine de l'érythropoïèse.	47
Figure 15 Voie intrinsèque de l'apoptose déclenchée par la diminution du taux d'Epo.	49
Figure 16 Voie extrinsèque de l'apoptose induite par la voie de Fas/FasL	50
Figure 17 Régulation négative de l'érythropoïèse des érythroblastes matures qui expriment le FasL sur les érythroblastes immatures exprimant Fas.	51
Figure 18 Rôles des caspases au cours de l'apoptose et la différenciation érythroïde terminale.	54
Figure 19 Structure d'Hsp70 et Hsp27.	57
Figure 20 Rôles anti-apoptotiques d'Hsp27	60
Figure 21 Rôles anti-apoptotiques d'Hsp70.	62
Figure 22 Nouveau rôle anti-apoptotique d'Hsp70.	148
Figure 23 Rôle d'Hsp70 dans la détermination du destin des érythroblastes sous Epo.	149
Figure 24 Modèle de la régulation dynamique de GATA-1 au cours de l'érythropoïèse.	150
Figure 25 Effets de c-Kit et REpo sur la localisation d'Hsp70.	152

Sommaire

Introduction	13
1 L'érythropoïèse	13
2 Rôles de GATA-1 au cours de l'érythropoïèse	17
2.1 Structure de GATA-1	17
2.2 Interactions protéine-protéine	18
2.3 Gènes cibles de GATA-1	19
Les enzymes de la synthèse de l'hème	19
Globines	20
L'érythropoïétine et le récepteur à l'érythropoïétine	20
Bcl-X _L	20
GATA-2	21
Gènes du cycle	21
2.4 Expression de GATA-1	21
2.5 Régulation de l'activité de GATA-1 par modifications post-traductionnelles	22
Acétylation	22
Phosphorylation	22
SUMOylation	23
2.6 Dégradation de GATA-1 par le protéasome	23
2.7 Les mutations de GATA-1 et les maladies humaines	24
3 Rôles des facteurs de croissance au cours de l'érythropoïèse	26
3.1 Le Stem Cell factor (SCF) et son récepteur c-Kit	26
Le SCF et le récepteur c-Kit	27
Voies de signalisations induites par c-Kit	29
3.2 L'érythropoïétine (Epo) et son récepteur REpo	32
Voies de signalisations induites par Repo	34
3.3 Coopération entre le SCF et Epo.	43
4 Régulation négative de l'érythropoïèse par l'apoptose	46
4.1 Activation de la voie intrinsèque de l'apoptose par la diminution du taux d'Epo	46
4.2 Activation de la voie extrinsèque de l'apoptose par la liaison de FasL sur son récepteur Fas.	49
5 Rôles des caspases dans la différenciation terminale érythroïde	52
6 Rôle des protéines de choc thermique (Hsp)	55
6.1 Les Hsp, protéines chaperonnes	55
6.2 Hsp27	58
Rôles anti-apoptotiques d'Hsp27	58
Rôle d'Hsp 27 dans la dégradation protéasomale	59
6.3 Hsp70	60
Rôles anti-apoptotiques d'Hsp70	60
Rôle d'Hsp70 dans la dégradation protéasomale	63
Rôle d'Hsp70 dans l'import nucléaire	63
Résultats	65
1 Rôle de la protéine de choc thermique Hsp70 au cours de la différenciation érythroïde terminale:	65
1.1 Contexte scientifique et situation du projet	65
1.2 Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3 mediated-cleavage of GATA-1	65
1.3 Conclusions article 1	79
2 Le SCF régule la localisation d'Hsp70 au cours de la différenciation érythroïde terminale normale et pathologique.	81
2.1 Contexte scientifique et situation du projet	81
2.2 c-Kit down regulation is essential for proper Hsp70 nuclear accumulation along terminal erythroid differentiation and is deregulated in MDS.	82
2.3 Conclusions article 2	102

3	Rôle de la tyrosine kinase Lyn sur la localisation subcellulaire d'Hsp70 au cours de la différenciation érythroïde terminale	103
3.1	Contexte scientifique et situation du projet	103
3.2	Matériels et Méthodes	104
	Isolement et culture de progéniteurs érythroïdes	104
	Transfection de progéniteurs CD34+	105
	Western Blotting	105
	Immunoprécipitation	106
	Génération de mutants d'Hsp70	106
	Culture et transfection des 293T	106
	Marquage immunocytologique et analyse par microscopie confocale	107
3.3	Résultats	107
	L'inhibition de Lyn induit la délocalisation nucléaire d'Hsp70	107
	L'Epo empêche l'export nucléaire d'Hsp70 par la voie Lyn	109
	Lyn induit la phosphorylation sur tyrosine d'Hsp70	109
	Localisation subcellulaire de mutants d'Hsp70	111
	Effet de Lyn sur la phosphatase SHP2.	112
3.4	Conclusions résultats 3	113
4	Rôle de la protéine de choc thermique Hsp27 au cours de la différenciation érythroïde terminale:	116
4.1	Contexte scientifique et situation du projet	116
4.2	Hsp27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation	116
4.3	Conclusions article 4	146
	<i>Discussion générale</i>	147
	<i>et perspectives</i>	147
1	Régulation fine de GATA-1 par les protéines de choc thermique Hsp70 et Hsp27.	147
2	Modèle de régulation de la localisation d'Hsp70 par C-Kit et REpo.	150
3	Implications dans des pathologies érythroïdes	152
3.1	Syndromes myélodysplasiques	152
3.2	Polyglobulie de Vaquez	155
	Annexes	157
	Annexe 1	157
	Annexe 2	169
	Annexe 3	172
	Références bibliographiques	175

Introduction

1 L'érythropoïèse

L'érythropoïèse est le processus de formation des érythrocytes à partir de cellules souches hématopoïétiques. Lors du développement chez les mammifères, l'érythropoïèse se déroule successivement dans le sac embryonnaire, dans le foie fœtal et chez l'homme adulte, elle a lieu uniquement dans la moelle osseuse. Ce processus est finement régulé par l'effet combiné du microenvironnement et des facteurs de croissance qui permettent la survie, la prolifération et/ou la différenciation des progéniteurs érythroïdes. L'érythropoïèse débute par l'engagement des cellules multipotentes (*colony-forming unit-granulocyte erythroid macrophage mixed* ou CFU-GEMM) vers des progéniteurs érythroïdes (figure 2) qui ont la capacité de former en 15 jours de culture en méthylcellulose des colonies d'érythroblastes *in vitro*, appelées *burst forming unit-erythroid* (BFU-E) (figure 1). Les progéniteurs capables de donner des BFU-Es sont les cellules hématopoïétiques les plus immatures déjà engagées dans la lignée érythroïde. Ces cellules représentent 0.03% des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse et seulement 40% des BFU-Es cyclent¹. Elles sont dépendantes du *stem cell factor* (SCF)² et d'autres facteurs de croissance hématopoïétiques pour leur prolifération et leur différenciation. Le précurseur érythroïde suivant est désigné *colony forming unit-erythroid* (CFU-E) et donne après 7 jours de culture en méthylcellulose de petites colonies empaquetées³ (figure 1). Les CFU-Es représentent 0.3% des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse et la plupart d'entre elles sont en cycle⁴. Les CFU-Es sont hautement dépendants de l'érythropoïétine (Epo)⁴.

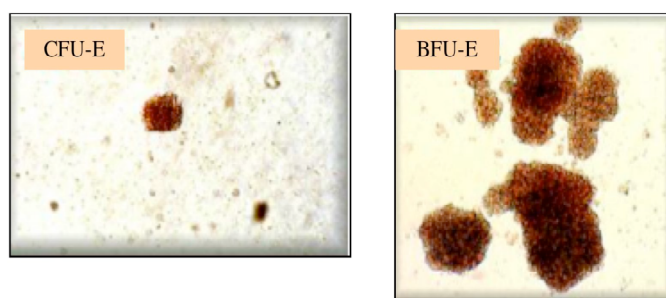


Figure 1 Photos de CFU-E et BFU-E

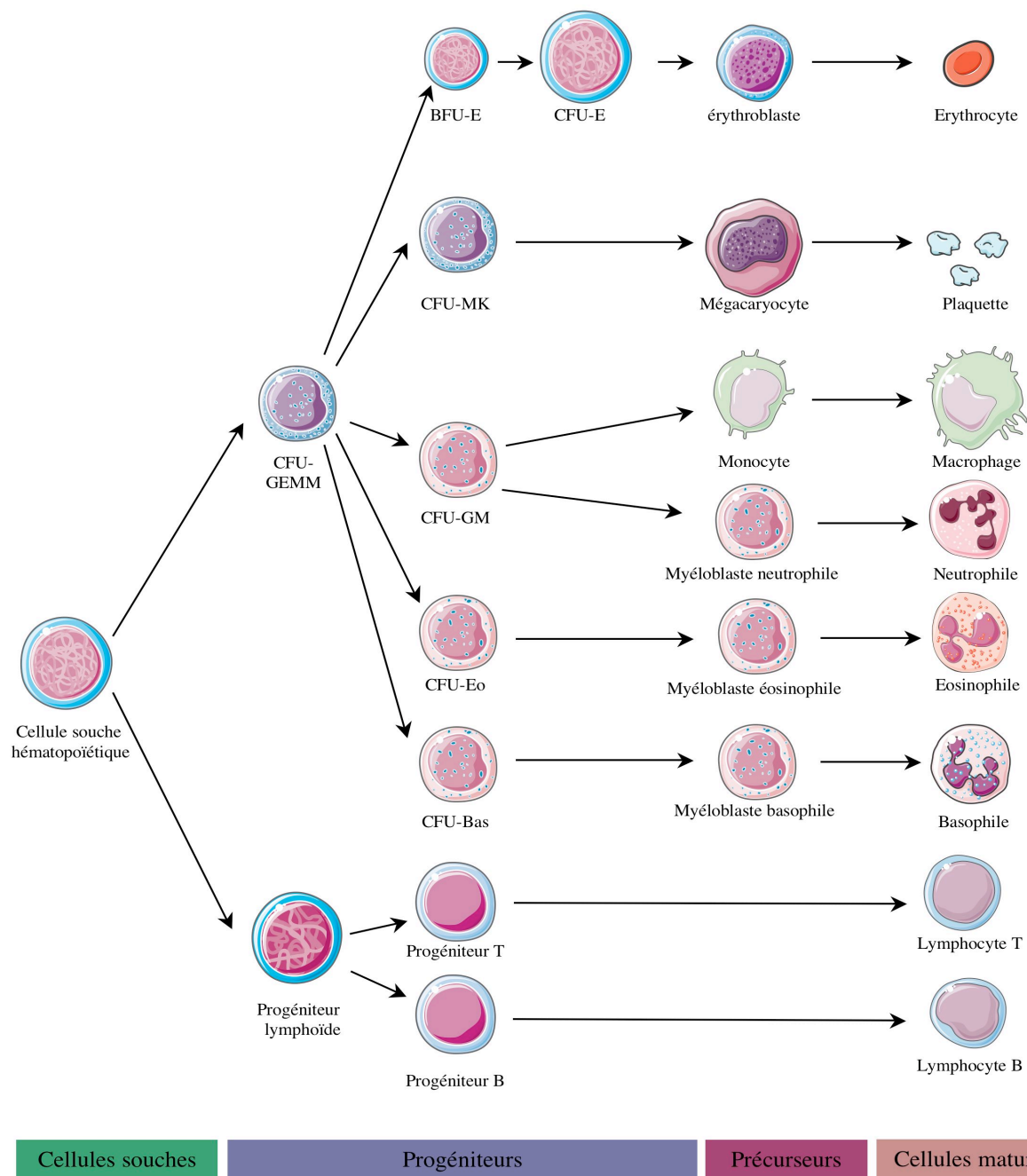


Figure 2 schéma de l'hématopoïèse

La cellule souche hématopoïétique donne naissance aux progéniteurs des lignées myéloïdes et lymphoïdes: progéniteurs pluripotents CFU-GEMM (*colony-forming unit granulocyte-erythroid-macrophage-megacaryocyte*) et progéniteurs lymphoïdes. Progéniteurs déterminés des différentes lignées myéloïdes: BFU-E (*burst-forming unit-erythroid*) CFU-E (*colony-forming unit-erythroid*) CFU- MK (*colony-forming unit-megakaryocyte*) CFU-GM (*colony-forming unit-granulocyte-macrophage*) CFU-M (*colony-forming unit-macrophage*) CFU-G (*colony-forming unit-granulocyte*) CFU-Eo (*colony-forming unit-eosinophil*) CFU-Bas (*colony-forming unit-basophil*). Les progéniteurs donnent naissance aux précurseurs qui se différencient en cellules matures.

Les progéniteurs CFU-Es vont se différencier en cellules morphologiquement identifiables de la lignée érythroblastique, les proérythroblastes, qui se différencient successivement en érythroblastes basophiles, polychromatophiles et acidophiles. Du stade proérythroblastes au stade érythroblastes basophiles, les précurseurs prolifèrent et se différencient, on considère que ce sont des érythroblastes immatures. A partir du stade polychromatophile, les érythroblastes continuent leur différenciation et sont dits matures. Les précurseurs érythroïdes expriment des antigènes de différenciation comme la glycophorine A (GPA), le récepteur à la transférine CD71 ou le CD36 (figure 3). Les érythroblastes subissent des transformations morphologiques comprenant une réduction progressive du volume cellulaire, une diminution du volume du noyau et une condensation très importante de la chromatine, acidification du cytoplasme et augmentation de la concentration en hémoglobine avant l'énucléation ⁵. L'énucléation de l'érythroblaste acidophile donne naissance au réticulocyte qui mature finalement en globule rouge migrant dans la circulation sanguine (figures 2 et 3). Les érythrocytes matures sont des disques biconcaves uniformes dépourvus d'organelles internes et contenant principalement de l'hémoglobine. La fonction de l'érythrocyte est l'apport en oxygène, les modifications morphologiques complexes durant la phase terminale de l'érythropoïèse en font une cellule très efficace. Une fois que l'érythrocyte a passé un long séjour dans la circulation sanguine, ils commencent à exprimer les phosphatidylsérines à leur surface. Cette molécule est reconnue par les macrophages réticulo-endothéliaux qui dégradent les érythrocytes âgés et recyclent la plupart des composants du globule rouge ⁶.

Dans un premier temps, l'engagement des progéniteurs multipotents vers la lignée érythroïde dépend et/ou est sans doute initié par l'activation d'une succession de facteurs de transcription tels que *basic-loop-helix factor* TAL-1 (ou SCL), LMO2 (*Lim-domain partner of TAL1*), GATA-2, GATA-1, FOG (Friend of GATA), RB (*retinoblastoma protein*), EKLF (*erythroid Krüppel-like factor*) et NF-E2 (p45NF-E2) ⁷ (figure 3). Des interactions protéines-protéines entre facteurs de transcription plus spécifiques de la lignée érythroïde tels que GATA-1 ⁸ et FOG-1 ⁹ sont aussi impliqués. Ensuite, des facteurs de croissances tels que l'Epo, le SCF ou encore IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) sont essentiels à la croissance des érythroblastes ⁷ (figure 3).

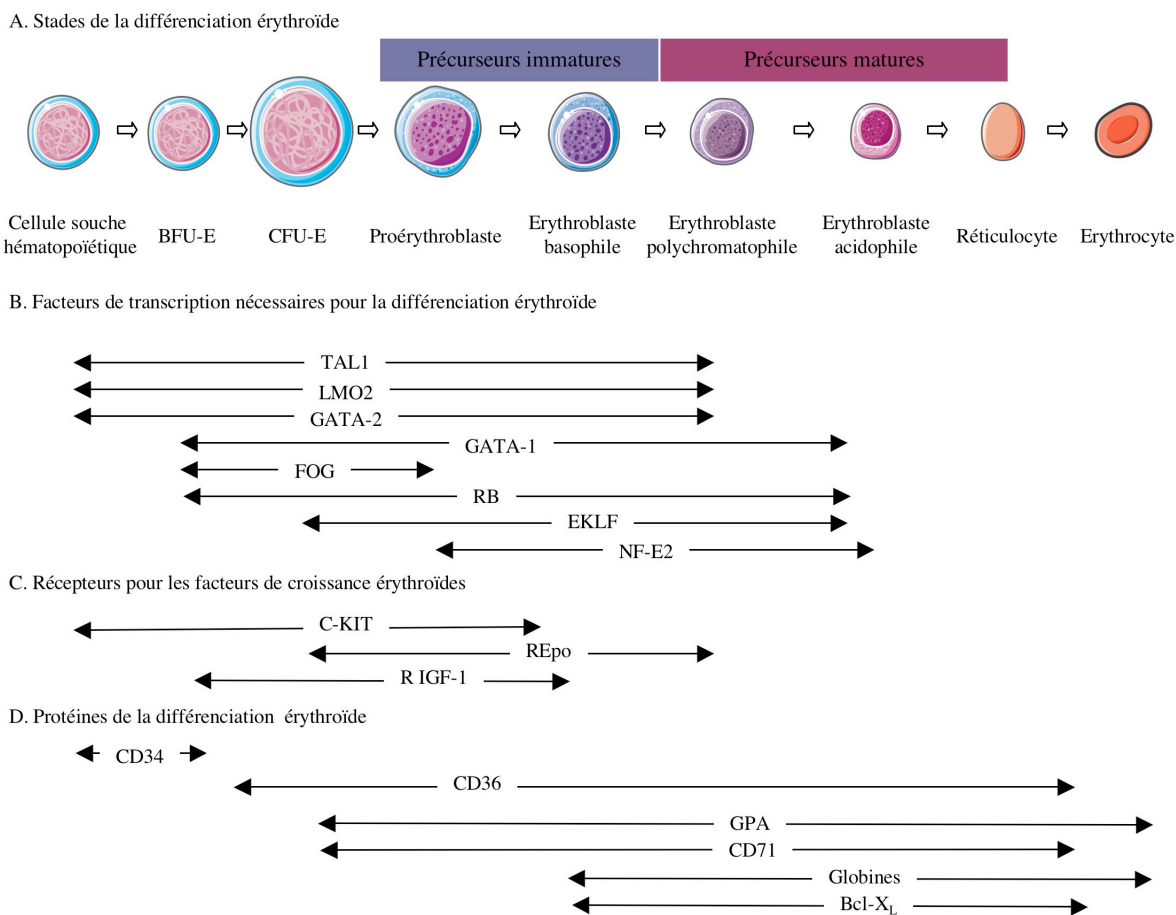


Figure 3 Différentes protéines exprimées au cours de l'érythropoïèse

(A) Taille relative et apparence morphologique des cellules érythroïdes aux différents stades de la différenciation érythroïde. (B) Facteurs de transcription érythroïdes : TAL1, LMO2, facteurs à doigt de zinc qui lient la séquence GATA (GATA-1, GATA-2), FOG, RB, EKLF, NF-E2. (C) Récepteurs pour les facteurs de croissance érythroïdes : *stem cell factor-receptor/c-Kit*, récepteur à l'érythropoïétine (REpo) et récepteur à l'*insulin-like growth factor-1* (R-IGF-1). (D) Protéines impliquées dans la structure et la fonction des cellules érythroïdes : glycophorine A (GPA), récepteur à la transférine (CD71), *B cell lymphoma-X_L* (Bcl-X_L). (E) marqueurs de surface exprimés ; *Cluster designation 34* (CD34) et *Cluster designation 36* (CD36), Pour chaque facteur de transcription, récepteur de facteur de croissance, protéines et marqueurs de surface, le degré d'expression peut varier pendant la période d'expression. (Adapté de la revue Koury et al., *Current Opinion in Hematology*, 2002).

2 Rôles de GATA-1 au cours de l'érythropoïèse

GATA-1 précédemment connu sous le nom de Eryf-1, NF-E1, NF-1 et GF-1 a été originellement identifié pour sa liaison spécifique au promoteur de la β -globine humaine ¹⁰ et aussi comme facteur de liaison à l'ADN spécifique des érythrocytes qui se fixe à une séquence régulatrice du gène de la globine du poulet ¹¹.

GATA-1 joue un rôle primordial au cours de l'érythropoïèse normale. Les cellules érythroïdes de souris déficientes pour GATA-1 subissent un arrêt de maturation au stade proérythroblaste ¹². La différenciation *in vitro* de cellules souches embryonnaires déficientes pour GATA-1 (G1E) confirment l'arrêt de l'érythropoïèse primitive et définitive au stade proérythroblaste ¹³ et montre que les précurseurs arrêtés dans leur différenciation meurent par apoptose ¹⁴. La mutation de GATA-1^{null} induit une létalité embryonnaire causée par une anémie sévère ¹⁵. Des embryons KO pour GATA-1 (GATA-1.05), exprimant seulement 5% du niveau d'expression de GATA-1 WT, montrent aussi un arrêt d'érythropoïèse primitive et meurent ¹⁶. D'autres souris KO pour GATA-1 (GATA-1 faible), exprimant seulement 20% du niveau d'expression de GATA-1 WT, montrent un phénotype plus léger. Bien que la plupart des souris GATA-1 faible meurent d'une différenciation érythroïde inefficace, quelques-unes naissent et survivent jusqu'à l'âge adulte ¹⁷. L'analyse de ces différents modèles de souris montre une relation directe entre le niveau d'expression de GATA-1 et la sévérité du phénotype.

Sur la base de ces observations que les érythroblastes GATA-1^{null} meurent par apoptose, Il a été suggéré que GATA-1 soit directement impliqué dans la survie cellulaire. En effet GATA-1 permet l'expression du récepteur à l'Epo ¹⁸. De plus, un autre gène cible de GATA-1 est *B cell lymphoma-X_L* (Bcl-X_L), un gène codant pour une protéine anti-apoptotique ¹⁹.

2.1 Structure de GATA-1

La famille des facteurs de transcriptions GATA est constituée de 6 membres, de GATA-1 à GATA-6, capables de lier la séquence consensus 5' A/T GATA A/G ²⁰. Ces protéines contiennent 2 motifs à doigts de zinc (Cys-X₂-Cys-X₁₇-Cys-X₂-Cys) spécifiques de la famille GATA. Le doigt de zinc en C-terminal est essentiel pour la fonction de GATA-1 puisqu'il est responsable de la reconnaissance de la séquence consensus GATA et donc de la liaison à l'ADN au niveau des gènes cibles ^{21,22}. GATA-1 possède également un doigt de zinc en N-terminal qui contribue à la stabilisation et à la liaison spécifique à l'ADN ^{21,23}. GATA-1

murin et humain utilisent deux sites d'initiation de traduction, cependant la Met84 interne est moins utilisée ²⁴. La version courte de GATA-1 (GATA-1s de 34 kDa) est dépourvue de domaine de transactivation en N-terminal et perd donc de sa capacité d'activateur de transcription. Chez la souris, l'expression de la forme courte de GATA-1 permet la mégacaryopoïèse, la formation de plaquettes et l'érythropoïèse ^{24bis}. Cependant, il semble que les effets de GATA-1s soient différents chez l'homme. En effet, au sein d'une famille, une mutation de *GATA-1* menant à l'expression de la forme de GATA-1s a été identifiée comme la cause d'une anémie sévère, avec une production normale de mégacaryocytes et plaquettes fonctionnellement et morphologiquement anormaux, chez les hommes hémizygotés ^{24ter}. Il semble donc que l'expression de la forme longue de GATA-1 soit essentielle pour une érythropoïèse et mégacaryopoïèse normales.

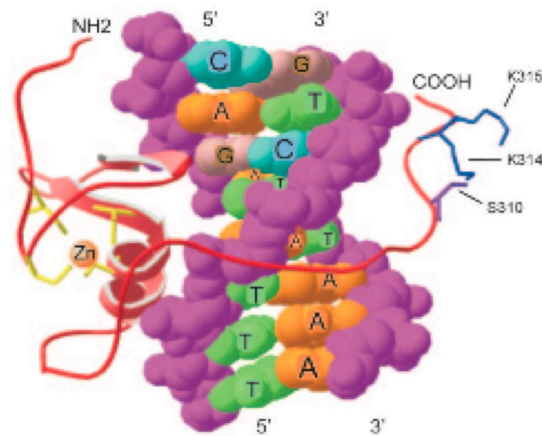


Figure 4 Structure en trois dimensions (3D) de GATA-1.

Représentation 3D de GATA-1 de poulet lié à l'ADN. La chaîne latérale des quatre résidus cystéines (jaune) qui lient l'atome de zinc, un résidu cible de la phosphorylation (S310, mauve) et deux résidus critiques de l'acétylation (K314 et K315, noir et bleu) sont montrés. Les résidus de l'ADN (5'-TTTATCTG-3' et 5'-CAGATAAA-3') sont notés et colorés. D'après Ferreira mol and cell Biol 2005. (D'après Ferreira et al, Molecular and Cellular Biology, 2005).

2.2 Interactions protéine-protéine

La fonction primaire de GATA-1 est de réguler la transcription de gènes majeurs pour le développement de cellules hématopoïétiques. GATA-1 joue ce rôle via la reconnaissance de son site de liaison consensus à l'ADN mais aussi via des interactions avec des cofacteurs. Il a

été montré que GATA-1 interagit avec lui-même, cMyb, EKLF, Fli-1, FOG, HDAC5, LMO2, PU.1, RUNX1, CREB-binding protein/P300, Ski1 et Sp1⁷.

Il semble que l'interaction entre GATA-1 et FOG soit essentielle pour l'érythropoïèse puisque les souris invalidées pour FOG (FOG^{null}) montrent une létalité embryonnaire liée à une anémie sévère²⁵. La liaison de FOG à GATA-1 laisse le doigt de zinc N-terminal libre et permet donc à GATA-1 d'interagir simultanément avec FOG et l'ADN²⁶.

Le produit du gène *spi-1* est PU.1, un membre de la famille des facteurs de transcription ETS qui interagit aussi avec GATA-1²⁷. PU.1 est nécessaire pour le développement du lignage lymphoïde et granulo-monocytaire. L'interaction entre GATA-1 et PU.1 est antagoniste. En effet, GATA-1 bloque l'activité de PU.1 et réprime donc la différenciation myéloïde dans les cellules se développant vers la voie érythroïde. A l'inverse, la répression de GATA-1 par PU.1 empêche la différenciation érythroïde. Dans le modèle animal de souris transgénique *spi-1/PU.1*, l'érythroleucémie développée est un procédé d'oncogénèse à plusieurs étapes²⁸. En effet, la surexpression de *spi-1/PU.1* entraîne un arrêt de différenciation au stade proérythroblaste induisant l'anémie qui peut être traitée par transfusion. Dans un second temps, des cellules malignes indépendantes de facteurs de croissance émergent et induisent la phase leucémique. Cet événement oncogénique est associé à une mutation gain de fonction du gène *c-Kit*, conférant une activité kinase constitutive du récepteur et la prolifération liée à l'activation des voies *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3-K) et *extracellular signal signal-regulated kinase* (Erk1/2). Cependant ce modèle de leucémogénèse à deux étapes n'a pas été retrouvé dans l'érythroleucémie humaine²⁹.

2.3 Gènes cibles de GATA-1

Les enzymes de la synthèse de l'hème

L'hémoglobine, présente en grande quantité dans les érythrocytes, est la protéine responsable du transport de l'oxygène et du dioxyde de carbone dans le corps. L'hémoglobine est une protéine tétramérique composée de 2 chaînes de globine α et de 2 chaînes de globine β . Chaque chaîne de globine porte un groupe d'hème, une molécule en forme d'anneau contenant un atome de fer central pouvant lier l'oxygène de manière réversible. L'hème est synthétisée à partir de la glycine et la succinyl coenzyme A via une série d'étapes impliquant huit enzymes. Plusieurs gènes codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'hème sont des cibles de GATA-1^{30,31}.

Globines

GATA-1 a été identifié dans un premier temps pour son interaction avec le promoteur du gène de la globine β puis il a été montré qu'il lie plusieurs régions régulatrices des loci des globines α et β ^{11,21,10}. Malgré l'absence de GATA-1 dans les souris GATA-1^{null}, les érythroblastes sont toujours capables de produire de l'hémoglobine suggérant ainsi que GATA-1 ne joue pas un rôle critique dans la transcription des gènes de la globine¹³. Une possibilité est que GATA-1 soit remplacé par GATA-2 qui est régulé positivement dans les souris GATA-1^{null}.

L'érythropoïétine et le récepteur à l'érythropoïétine

Il a été montré que GATA-1 est impliqué dans la régulation positive de la transcription du gène du REpo³². Par la suite, il a été démontré que GATA-1 est exprimé avant le REpo mais que son expression est augmentée par le signal médié par le REpo permettant ainsi une amplification de la transcription de GATA-1¹⁸ (figure 3). Il semble donc que le REpo ne soit pas le déterminant primaire de la différenciation érythroïde, à la différence de GATA-1. De manière surprenante, le REpo est transcrit normalement dans les érythroblastes GATA-1^{null}, suggérant fortement un rôle de GATA-2 dans l'expression du REpo dans les précurseurs érythroïdes précoces¹³.

Si GATA-1 régule positivement le REpo, GATA-1 régule négativement l'expression de l'Epo. En effet, GATA-1 se lie au site GATA présent dans le promoteur de ce gène, induisant la diminution significative du niveau d'expression de l'ARNm de l'Epo^{33,34}.

Bcl-X_L

Bcl-X_L appartient à la famille des protéines Bcl-2 qui agissent comme régulateurs importants de la mort cellulaire. Bcl-X_L est une protéine anti-apoptotique, elle empêche la dépolarisation de la mitochondrie. Outre son rôle anti-apoptotique, Bcl-X_L intervient dans la différenciation érythroïde, elle est impliquée dans la régulation de la synthèse de l'hème³⁵.

L'expression de Bcl-X_L augmente dans la phase tardive de la différenciation érythroïde (figure 3) et semble être dépendante de la présence d'Epo. GATA-1 joue un rôle important dans la régulation positive de l'expression du gène de Bcl-X_L. Il a été montré dans des cellules souches embryonnaires que GATA-1 induit fortement Bcl-X_L permettant un rôle anti-apoptotique majeur de GATA-1 au cours de l'érythropoïèse¹⁹. Les souris invalidées pour Bcl-X_L meurent de défauts dans le cerveau et d'anémie sévère et l'inactivation de Bcl-X_L³⁶ dans le lignage hématopoïétique induit une anémie hémolytique sévère³⁷. Bien que ces deux modèles permettent une production de BFU-E et CFU-E normale, l'apoptose et un défaut de maturation entraînent l'anémie. Ceci suggère que GATA-1, en coopération avec l'Epo,

empêche l'apoptose des érythroblastes en cours de différenciation, en permettant l'expression de protéines anti-apoptotiques telle que Bcl-X_L.

GATA-2

GATA-2 est un régulateur majeur de l'hématopoïèse précoce et il est crucial que son expression soit régulée négativement pour la différenciation. Le premier indice montrant que GATA-1 est impliqué dans la régulation du gène *GATA-2* est basé sur l'observation que *GATA-2* est régulé positivement en l'absence de GATA-1¹³. De plus, il a été montré que l'expression de *GATA-2* est régulée négativement par GATA-1^{38,31}. En l'absence de GATA-1, *GATA-2* se fixe sur une région en amont de son promoteur, recrute CBP à ce locus, ce qui permet l'acétylation et l'activation de la transcription de *GATA-2*. GATA-1 induit la diminution d'expression de *GATA-2* en se fixant sur cette région en amont du promoteur de *GATA-2*, empêchant ainsi GATA-2 et CBP de s'y lier³⁹.

Gènes du cycle

Des mutations de GATA-1 sont associées à la prolifération de précurseurs hématopoïétiques et l'apparition de leucémie, suggérant un rôle de GATA-1 dans le contrôle du cycle⁴⁰. En effet, GATA-1 intervient dans la régulation de la progression du cycle en G1/S. Ainsi, GATA-1 inhibe l'expression de *cyclin-dependant kinase* (Cdk) 6, de la cycline D2 et induit l'expression d'inhibiteurs de Cdk tels que p18^{INK4C} ou p27^{Kip1}. GATA-1 permet donc la différenciation érythroïde mais aussi l'arrêt du cycle nécessaire à la différenciation terminale³¹.

2.4 Expression de GATA-1

Le gène *GATA-1* contient deux promoteurs distincts identifiés originellement comme spécifiques du testicule et des cellules érythroïdes. Les deux promoteurs contiennent des sites GATA nécessaires pour la bonne activité du promoteur, suggérant qu'il existe une boucle de contrôle positif dans la régulation de GATA-1⁴¹.

GATA-1 est fortement exprimé dans les cellules hématopoïétiques, notamment les cellules érythroïdes⁴², les mastocytes⁴³, les mégacaryocytes^{43,44}, les éosinophiles⁴⁵ mais aussi à un bas niveau dans les cellules de Sertoli du testicule de jeunes souris^{45bis}.

2.5 Régulation de l'activité de GATA-1 par modifications post-traductionnelles

L'activité de GATA-1 *in vivo* est finement régulée. L'absence de GATA-1 conduit à un arrêt de maturation et à l'apoptose des progéniteurs érythroïdes ^{12,13,14,15,16}. A l'inverse, l'augmentation de son activité peut mener à un phénotype tel que la létalité embryonnaire ⁴⁶. L'activité de la protéine est régulée notamment par modifications post-traductionnelles de GATA-1 telles que l'acétylation, la phosphorylation et la sumoylation.

Acétylation

GATA-1 peut être acétylé *in vivo* et *in vitro* par l'*acétyltransférase P300* ⁴⁷ et la *CREB binding protein* (CBP) ⁴⁸. GATA-1 murin est acétylé sur deux motifs riches en lysines localisés en C-terminal de chaque doigt de zinc (figures 4 et 5). L'interaction entre GATA-1 et P300/CBP et par conséquent, l'acétylation du facteur de transcription, stimule son activité transcriptionnelle ⁴⁹. Des mutants d'acétylation de GATA-1 ont une capacité de liaison à la chromatine diminuée ⁵⁰. L'acétylation de GATA-1 semble nécessaire pour la différenciation *in vitro* de la lignée cellulaire G1E GATA-1^{null} puisque des mutants des sites d'acétylation de GATA-1 altèrent la différenciation érythroïde ⁴⁸.

Phosphorylation

GATA-1 est phosphorylé constitutivement sur six résidus sérines situés en N-terminal (26, 49, 72, 142, 178, 187) et un septième situé près du domaine de liaison à l'ADN (310) (figure 5) après l'induction de la différenciation érythroïde ⁵¹. Ceci suggère un rôle possible de la phosphorylation dans la liaison à l'ADN ou dans l'activité transcriptionnelle de la protéine. Une étude montre que la substitution des sérines en alanines, qui mime une déphosphorylation, ne révèle aucune conséquence, ni sur la liaison à l'ADN, ni sur l'activité transcriptionnelle de GATA-1 ^{51 52}. D'autres études montrent le contraire. En effet, la phosphorylation de GATA-1 dans les K562 augmente sa liaison à l'ADN ⁵³. Il a été démontré que la signalisation de *mitogen activated protein kinase* (MAPK) via ERK induit la phosphorylation de GATA-1 en réponse à l'EGF dans la lignée COS ⁵⁴. Une autre étude a montré que la phosphorylation de GATA-1 sur la sérine 26 par les MAPK prodigue à GATA-1 son activité anti-apoptotique en régulant positivement l'expression de Bcl-X_L ⁵⁵. D'autre part, il semble que la stimulation du REpo induise la phosphorylation de GATA-1 sur la sérine 310 par la voie PI3-K/AKT. La phosphorylation de la S310 augmente l'activité transcriptionnelle de GATA-1 et semble importante pour la maturation dépendante d'Epo des progéniteurs érythroïdes de foie fœtal ⁵⁶.

SUMOylation

La sumoylation est une modification réversible qui peut être associée à une répression de la transcription⁵⁷. Le site consensus de sumoylation (I/L/V)KXE est la K137 sur GATA-1 murin (figure 5). Ce motif peut être modifié par sumoylation par l'action de la ligase SUMO PIASy⁵⁸. La signification fonctionnelle de cette modification est encore inconnue.

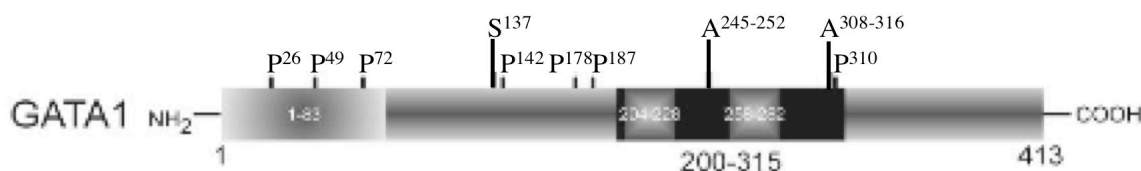


Figure 5 **Représentation schématique de la protéine GATA-1.**

Le domaine hautement conservé comprenant le doigt de zinc est représenté en noir, les régions entre les cystéines chélateur de zinc sont grisées. Le domaine d'activation N-terminal (aa de 1 à 83) et les sites d'acétylation (A), de phosphorylation (P) ou de sumoylation (S) sont indiqués par des nombres commençant à la première méthionine de la protéine. (D'après Ferreira et al, Molecular and Cellular Biology, 2005).

2.6 Dégradation de GATA-1 par le protéasome

Le protéasome est impliquée dans la dégradation des facteurs de transcription actifs. Ceci limite la demi-vie du facteur au promoteur et donc aussi le niveau de transcription.

L'activité mais aussi le niveau d'expression de GATA-1 doivent être régulés pour une différenciation érythroïde normale⁵⁹. Il est probable que la toxicité d'un niveau de GATA-1 élevé soit liée à son activité transcriptionnelle sur les gènes du cycle cellulaire³¹. De plus, comme GATA-1 auto-régule son propre promoteur, l'activité de GATA-1 doit être finement régulée afin d'éviter une accumulation continue de GATA-1 dans les cellules⁴¹.

Il a été montré que la forme acétylée et ubiquitinée de GATA-1 est dégradée par le protéasome. Comme l'acétylation entraîne l'activation de GATA-1, mais aussi entraîne son ubiquitinylation, l'activation et la dégradation de GATA-1 sont intimement liées. De plus, l'acétylation seule n'est pas suffisante pour la dégradation de GATA-1, la phosphorylation de la protéine est essentielle pour que la dégradation survienne. Les deux modifications sont donc nécessaires et la forme active acétylée de GATA-1 peut rester fixée au promoteur jusqu'à sa dégradation induite par phosphorylation médiée par les MAPK⁶⁰.

2.7 Les mutations de GATA-1 et les maladies humaines

Un nombre de mutations de GATA-1 sont liées à des maladies humaines et dans la plupart des cas, des mutations qui modifient les interactions moléculaires de GATA-1 ont été identifiées. Cinq mutations non-sens dans le doigt de zinc N-terminal ont été retrouvées dans des cas de thrombocytopénie, anémie et thalassémie. Une de ces mutations (R216Q) empêche la capacité de liaison du doigt de zinc N-terminal à l'ADN résultant en une thrombocytopénie liée à l'X avec thalassémie (XLTT) ⁶¹. Deux mutations, V205M et G208S, rendent la protéine GATA-1 mutée dans le doigt de zinc N-terminal incapable d'interagir avec FOG ²⁶ induisant l'anémie et la thrombocytopénie. Une autre mutation dans le doigt de zinc N-terminal (D218) résulte en un désordre similaire mais sans affecter la liaison de GATA-1 avec FOG ou l'ADN (figure 6).

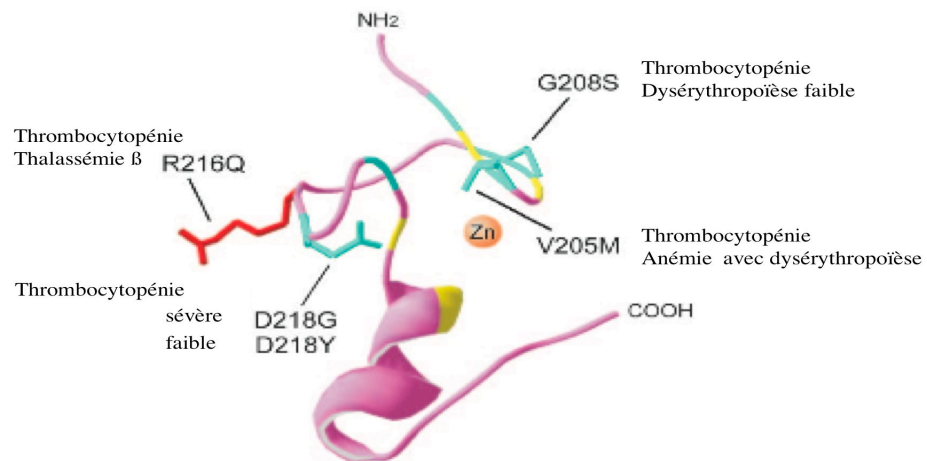


Figure 6 Mutations dans le domaine N-terminal de GATA-1 causant des maladies chez l'homme.

L'atome de zinc est représenté par la sphère orange. Les cystéines chélateur de zinc sont indiquées en jaune. Les résidus impliqués dans la liaison de GATA-1 avec Fog-1 sont représentés en vert. Les résidus mutés retrouvés chez les patients sont indiqués ; les mutations V205M, G208S, D218G et D218Y interfèrent avec la liaison de FOG-1, la mutation R216Q interfère avec la liaison à l'ADN (rouge). D'après Ferreira mol and cell Biol 2005. (D'après Ferreira et al, Molecular and Cellular Biology, 2005).

Des mutations ont été observées dans d'autres régions de GATA-1. Chez les patients atteints du syndrome de Down, qui présentent un risque élevé de développer une leucémie aiguë mégacaryoblastique, des mutations de *GATA-1* induisent un codon stop prématuré dans la séquence codant le domaine de transactivation. Ces mutations restreignent la traduction à démarrer au M84 produisant ainsi uniquement la forme de GATA-1 courte qui a perdu le

domaine de transactivation en N-terminal. La capacité de liaison à l'ADN et l'interaction avec FOG-1 sont maintenues, mais l'activité transcriptionnelle de GATA-1 est diminuée ⁴⁰. Le nombre relativement faible de maladies liées à une mutation de GATA-1 est probablement une indication que la plupart des mutations de la protéine sont létales, ce qui prouve le rôle central de GATA-1 dans le développement érythroïde.

3 Rôles des facteurs de croissance au cours de l'érythropoïèse

Le système hématopoïétique assure la production continue de cellules afin de renouveler les éléments sanguins matures qui répondent à la demande en oxygène physiologique. La production des érythrocytes représente le plus haut rendement du système hématopoïétique, avec un taux de production estimé à 2×10^{11} érythrocytes par jour et ceci, grâce à un index de prolifération élevé au cours de l'érythropoïèse terminale¹³.

L'homéostasie des cellules érythroïdes est contrôlée par des signaux positifs et négatifs qui régulent la survie, l'expansion et la maturation des progéniteurs et des précurseurs érythroïdes. Des facteurs intracellulaires et extracellulaires tels que respectivement les facteurs de transcription et les cytokines jouent un rôle clé dans la régulation de l'érythropoïèse.

La régulation de l'érythropoïèse passe par l'action conjuguée de différentes cytokines telles que la thrombopoïétine (TPO), l'interleukine-3 (IL-3), l'interleukine-6 (IL-6), l'interleukine-8 (IL-8), l'interleukine-9 (IL-9), l'interleukine-11 (IL-11) et le *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF)⁶². Cependant, aucun de ces facteurs n'est critique pour le développement érythroïde *in vivo*. Par contre, le facteur de croissance SCF favorise la survie et la prolifération des progéniteurs pluripotents et des BFU-Es. A partir du stade CFU-E, la survie et la prolifération des progéniteurs et des précurseurs érythroïdes sont principalement sous le contrôle de l'Epo. Dans ce travail, nous nous intéressons principalement à l'effet du SCF et de l'Epo sur l'érythropoïèse (figure 3).

3.1 Le Stem Cell factor (SCF) et son récepteur c-Kit

Le SCF, aussi connu sous le nom de *Kit ligand*, facteur de croissance des mastocytes ou *steel factor*, est une cytokine hématopoïétique qui se lie à son récepteur c-Kit. Celui-ci est exprimé dans les progéniteurs hématopoïétiques et son expression est diminuée au cours de la maturation, sauf pour les mastocytes^{62bis}. Dans des souris mutantes *White spotting* et *Steel* qui sont respectivement mutées pour le gène *c-Kit* et *SCF*, les mutations dans les loci du récepteur ou de son ligand entraînent une anémie fatale, des défauts de la cellule souche et un déficit en mastocytes. L'interaction c-Kit/SCF joue donc un rôle essentiel dans le développement des progéniteurs érythroïdes puisque les mutants homozygotes meurent d'une anémie sévère au cours du développement embryonnaire ou après la naissance^{63,64}.

Le SCF et le récepteur c-Kit

Le SCF est une cytokine fabriquée par les cellules stromales de la moelle osseuse ⁶⁵. La concentration de SCF dans le sérum humain normal est en moyenne de 3,3 ng/ml ⁶⁶. Le niveau de SCF dans la circulation n'est pas inversement lié à l'hématocrite ⁶⁷. Actuellement, il n'y a aucun argument démontrant l'existence d'une régulation de la production de SCF en fonction de l'hypoxie tissulaire ou à l'inverse en fonction de l'hyperproduction de globules rouges. Son expression semble constitutive et il est probable que le taux de SCF disponible soit dépendant du taux de consommation de SCF par c-Kit et donc aussi du niveau d'expression de c-Kit à la surface des précurseurs érythroïdes.

Il existe deux isoformes distinctes de SCF qui résultent du splicing de l'ARNm ⁶⁸. Le SCF existe donc sous une forme soluble et une forme trans-membranaire qui semble prédominer pour la régulation de l'érythropoïèse puisque les souris n'exprimant que la forme soluble sont anémiques ^{64, 69, 68}. Des études *in vitro* montrent que la forme trans-membranaire peut-être un régulateur important de l'activation de c-Kit et permet d'augmenter le temps de demi-vie du récepteur alors que la forme soluble entraîne l'internalisation rapide et la dégradation de c-Kit ⁷⁰.

La signalisation de c-Kit est majeure pour l'érythropoïèse, la lymphopoïèse, le développement et la fonction des mastocytes, la mégacaryopoïèse, la gamétogenèse et la mélanogénèse ⁷¹. Les cellules souches, dans l'embryon et chez l'adulte, ont la possibilité unique de choisir entre renouvellement et différenciation pour que les cellules matures nécessaires à la fonction des organes soient générées et remplacées sans diminuer le pool de cellules souches de départ. L'origine du terme « *stem cell factor* » fait référence à son rôle initial dans la survie, le renouvellement et la différenciation des cellules souches. Le récepteur c-Kit est exprimé sur la majorité des progéniteurs hématopoïétiques CD34+ ^{72, 73} et son expression est élevée au cours des stades BFU-E, CFU-E de la différenciation érythroïde ^{74, 75, 72, 76}. L'expression de c-Kit augmente jusqu'au stade CFU-E et persiste jusqu'au stade d'érythroblaste basophile puis diminue et disparaît à la surface des érythroblastes polychromatophiles et orthochromatophiles ⁷⁷ (figure 3).

En activant c-Kit, le SCF induit des signaux de survie et de prolifération pour les progéniteurs érythroïdes. En ralentissant la différenciation des érythroblastes les plus matures, il permet une expansion des progéniteurs les plus immatures ayant les potentiels prolifératifs les plus importants ⁷⁸. Cet effet permet le renouvellement des progéniteurs érythroïdes précoces et des précurseurs avant qu'ils ne perdent la capacité de se diviser. Le SCF agit en

synergie avec d'autres facteurs pour la prolifération, notamment avec l'IL-3, l'IL-1, l'IL-6 et l'Epo⁷⁹. Outre son effet positif sur la prolifération, le SCF permet la survie des érythroblastes en présence d'Epo ou lors de l'activation de la voie Fas. Au stade CFU-E, le rôle principal du SCF est d'empêcher l'apoptose et permettre la prolifération, en synergie avec l'Epo. En effet, il a été montré que c-Kit interagit avec le REpo⁸⁰. De plus, il a été montré que le SCF empêche l'apoptose induite par Fas des progéniteurs érythroïdes⁸¹. Le SCF empêche l'activation des caspases-3 et 8 induites par Fas sans diminuer l'expression de Fas dans les progéniteurs érythroïdes GPA+ c-Kit+ et ce d'une manière *Lck/Yes-related novel tyrosine kinase* (Lyn) dépendante⁸².

Plus de 30 mutations gain de fonction de c-Kit ont été identifiées et sont associées à des tumeurs malignes humaines⁸³. Les mutations activatrices D816V ou D816Y et D816F dans le domaine kinase de c-Kit sont associées à une mastocytose humaine et leucémie aigue myéloïde (LAM). La mutation D816V a aussi été retrouvée dans les cellules mononuclées du sang périphérique de patients atteints de mastocytose avec un syndrome myélodysplasique (SMD) associé et dans la plupart des mastocytoses systémiques⁸⁴. La plupart des mutations activatrices dans la région juxtamembranaire de c-Kit (V560G) est associée à une tumeur gastro-intestinale (GIST pour *gastrointestinal stromal tumor*)⁸³. Actuellement, un inhibiteur de tyrosine kinase le STI-571 ou Gleevec est utilisé pour traiter les patients atteints de GIST et quelques patients LAM c-Kit positifs. Malheureusement des mutations de c-Kit associées à une mastocytose sont résistantes au STI-571.

Voies de signalisations induites par c-Kit

Le SCF agit sur son récepteur c-kit, un membre de la famille des récepteurs à tyrosine kinase de type III. c-Kit est une glycoprotéine de 145 kDa appelée aussi CD117⁸⁵. La structure du récepteur inclut un domaine extracellulaire avec 5 domaines type Ig, un court domaine membranaire et un domaine cytoplasmique à activité tyrosine kinase⁸⁶ (Figure 7).

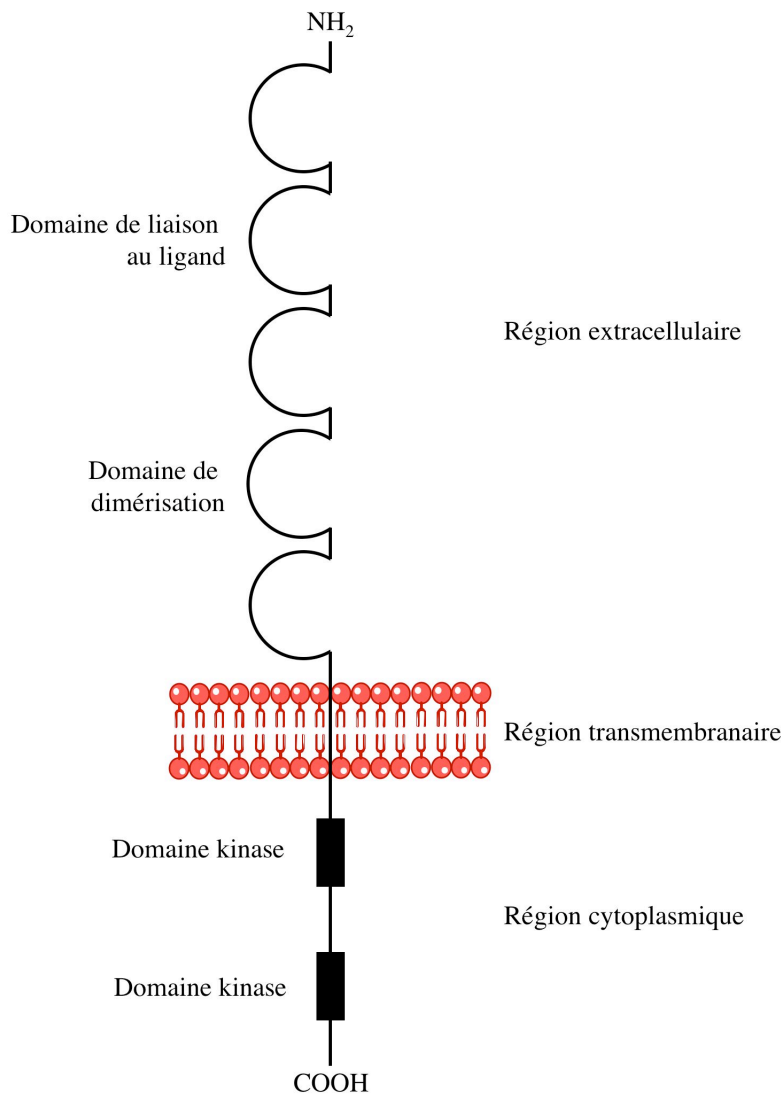


Figure 7 Représentation schématique du récepteur c-Kit.

Le site de liaison à l'ATP est situé dans le domaine kinase jouxtant la membrane cellulaire. La région phosphotransférase est dans le domaine kinase distal de la membrane cellulaire.

La liaison du SCF sur c-Kit résulte en la dimérisation et l'autophosphorylation du récepteur sur différents résidus tyrosines cytoplasmiques spécifiques qui deviennent ainsi des sites de liaison pour les molécules de transduction du signal contenant des domaines SH2 et les protéines adaptateurs⁸⁷: phospholipase C γ (PLC γ) sur la tyrosine 728⁸⁸, la sous-unité p85 de la PI3-K sur la tyrosine 719⁸⁹, les kinases de la famille Src sur les tyrosines 567/569^{90,91,92,93}, Grb2 sur la tyrosine 702 et Grb7 sur la tyrosine 934⁹⁴.

La régulation négative de la signalisation de c-Kit est médiée par diverses phosphatases, notamment SHP-1, SHP-2 et SHIP (*SH2-containing inositol phosphatase*). SHP-1 interagit avec le récepteur phosphorylé sur la tyrosine 569 et le déphosphoryle^{95,96}. SHP-2 interagit avec c-Kit sur la tyrosine 567⁹⁷ et influence l'activation de la voie MAPK. SHIP régule négativement la signalisation de c-Kit lors de la dégranulation des mastocytes⁹⁸. (Figure 8).

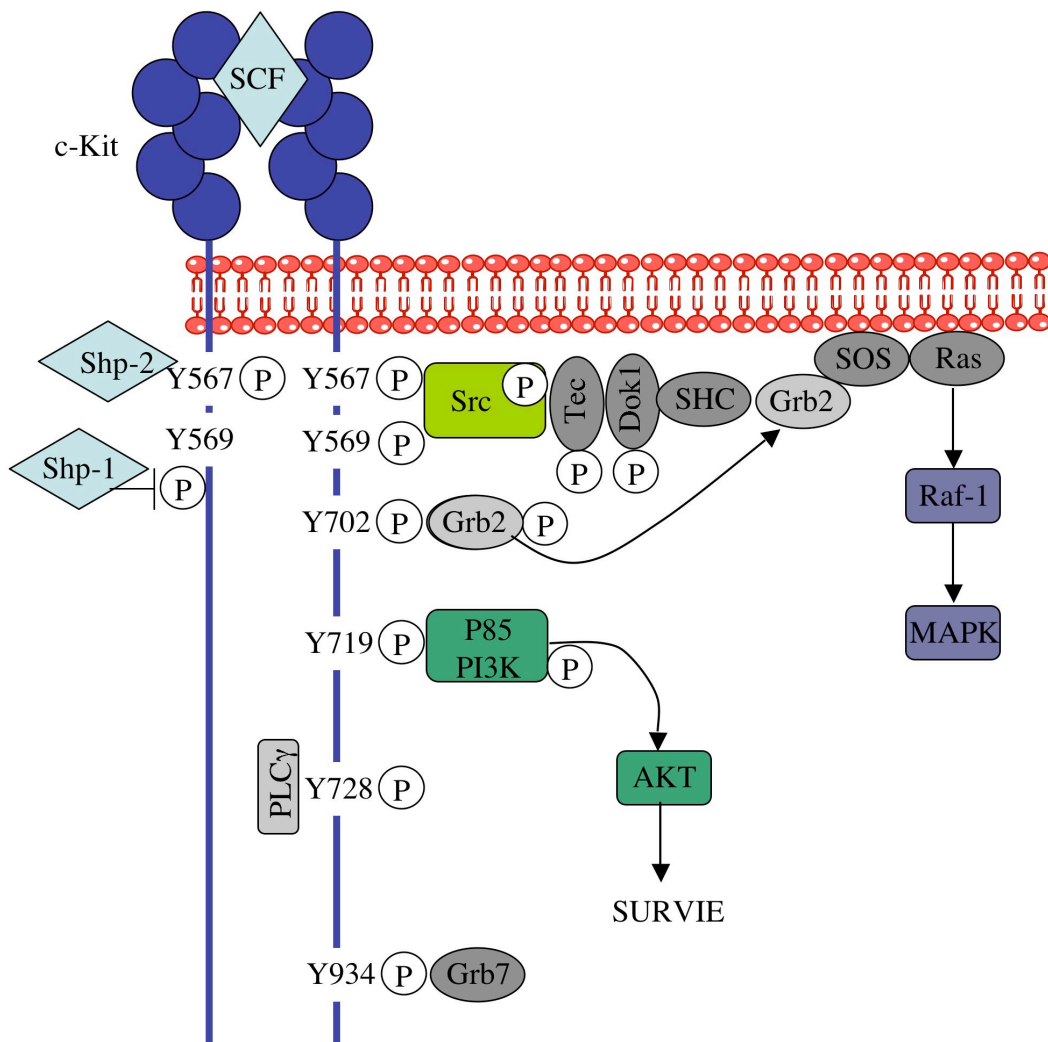


Figure 8 **Résumé des voies de signalisation activées par c-Kit murin en réponse au SCF.**

D'après Manugalavdla et Kapur, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2005).

Bien que le rôle précis de chacune de ces voies de signalisation activées par c-Kit en réponse au SCF ne soit pas bien établi, toutes sont impliquées dans la prolifération et la survie. Il semble que la PI3-K et les kinases de la famille Src jouent un rôle essentiel en réponse au SCF dans la prolifération et la survie des mastocytes ⁹². Afin de mieux définir le rôle de la signalisation induite par c-Kit dans la lignée érythroïde, Wiess et al ⁹⁹, et Gregory et al ¹⁹, ont décrit la lignée érythroïde G1E-ER2 qui reproduit la dépendance du SCF et de l'Epo des proérythroblastes pour leur survie, prolifération et différenciation. A l'aide de cette lignée et de mutants de c-Kit, il a été mis en évidence que l'inactivation d'une des cinq voies activées par le SCF (PLC γ , PI3-K, Src, Grb2, Grb7) entraîne une diminution significative de la croissance et la prolifération des cellules érythroïdes. Cependant, l'inactivation de la voie des Src kinases entraîne le défaut de prolifération le plus sévère ¹⁰⁰.

Le mutant de c-Kit qui empêche la liaison et l'activation de la famille des kinases Src (Y567/569F) entraîne un défaut profond de prolifération des progéniteurs érythroïdes. Cependant, aucune des souris KO pour la famille des Src ne montre de défaut de la lignée érythroïde. Ceci peut partiellement s'expliquer par les fonctions redondantes entre les différents membres de la famille des kinases Src. Par contre, lors de l'anémie induite chez la souris, la mutation Y567F de c-Kit modifie l'érythropoïèse de stress. En effet, la prolifération et la survie des progéniteurs érythroïdes sont alors altérées. Il semble que la voie Mek/Erk ne soit pas affectée mais que les voies AKT et spécialement JNK2/p54 soient atténuées ¹⁰¹. Il semble donc que la phosphorylation de la Y567 de c-Kit et les voies de signalisation activées par la suite dans les érythroblastes de la rate soient critiques pour l'érythropoïèse de stress.

D'autre part, les cellules érythroïdes exprimant un mutant de c-Kit qui ne permet pas la liaison avec la sous-unité p85 de la PI3K (Y719F) ne montre qu'une diminution légère mais significative de la prolifération et la survie. Ceci peut peut-être s'expliquer par le fait que la PI3K peut être activée par deux mécanismes distincts en réponse à la stimulation par le SCF ; par la liaison directe du domaine SH2 de la sous-unité p85 de la PI3K au résidu tyrosine 719 phosphorylé du c-Kit ou par le biais de la kinase Src ¹⁰². A l'inverse de la Y567 de c-Kit, la Y719 ne semble pas critique pour l'érythropoïèse de stress ¹⁰¹.

Par ailleurs, la voie des MAPK (cRaf/Mek /Erk où Mek est MAPK/Erk kinase) est activée suite à la liaison du SCF sur c-Kit par la petite GTPase Ras. Une fois activé, Erk migre dans le noyau où il régule l'expression de gènes en phosphorylant différents facteurs de transcription. La voie de signalisation des MAPK est impliquée dans la prolifération cellulaire des progéniteurs hématopoïétiques ^{103,104}, cependant aucun effet sur la prolifération par les MAPK n'a été démontré dans les progéniteurs érythroïdes en réponse au SCF.

3.2 L'érythropoïétine (Epo) et son récepteur REpo

L'Epo, glycoprotéine rénale, est donc le régulateur majeur de la production de globules rouges et délivre les signaux essentiels de croissance, survie et différenciation aux progéniteurs et précurseurs érythroïdes. Les souris invalidées pour le REpo ou l'Epo présentent une létalité embryonnaire d'anémie liée à un défaut de développement érythroïde au stade CFU-E¹⁰⁵. L'Epo n'est pas nécessaire au stade précoce de l'érythropoïèse, incluant le stade BFU-E et l'administration *in vivo* d'Epo a peu d'influence sur le nombre de BFU-Es. Par contre, l'administration d'Epo augmente fortement le nombre de CFU-Es et de précurseurs érythroïdes jusqu'au stade d'érythroblastes basophiles, principalement en évitant leur apoptose et à un moindre degré en augmentant leur prolifération. Il ne semble pas que le récepteur de l'Epo puisse envoyer des signaux spécifiques de différenciation.

Les progéniteurs et précurseurs érythroïdes présentent des sensibilités différentes à l'Epo qui correspondent à la gamme de concentration d'Epo sérique à l'état normal et anémique. En cas de besoins accrus (hypoxie au cours du développement embryonnaire, hémorragie), la concentration d'Epo synthétisée par le rein augmente et induit la survie de la majorité des progéniteurs CFU-Es, permettant la formation d'un grand nombre d'érythrocytes et une réponse rapide aux modifications de l'environnement¹⁰⁶. A de faibles concentrations d'Epo, seuls les progéniteurs et précurseurs hypersensibles vont survivre. C'est pourquoi, la régulation de l'apoptose des progéniteurs pendant le stade de dépendance à l'Epo explique le contrôle rapide mais finement régulé de la population d'érythrocytes en réponse à l'hypoxie, l'hyperoxie et l'anémie, sans effet de l'Epo sur la prolifération et la différenciation. Dans ce modèle, la concentration en Epo module le taux d'apoptose des progéniteurs et précurseurs érythroïdes.

Depuis que le gène de l'Epo a été cloné¹⁰⁷, l'Epo recombinante humaine est utilisée massivement pour traiter diverses formes d'anémies, premièrement chez des patients souffrant d'insuffisance rénale. Malheureusement, l'Epo est aussi une « drogue de choix » pour les athlètes d'endurance qui parfois, meurent avec un hématokrite extrêmement élevé lié à un surdosage d'Epo¹⁰⁸.

L'Epo exerce son effet en stimulant le récepteur à haute affinité REpo dont l'expression d'approximativement 1000 récepteurs est maximale au stade CFU-E et érythroblaste orthochromatique^{109,110} (figure 3). Le REpo est exprimé sur les progéniteurs

érythroïdes de la moelle osseuse mais aussi dans divers tissus non hématopoïétiques tels que les myocytes, les neurones corticaux et les épithélium prostatiques, du sein et des ovaires. Les souris invalidées pour le REpo ont une diminution du nombre de progéniteurs neuronaux et montrent une sensibilité accrue à l'hypoxie. Les cardiomyocytes de ces souris ne répondent pas à la stimulation à l'Epo et montrent une hypoplasie du myocarde ¹¹¹. La létalité embryonnaire de ces souris peut être corrigée par l'introduction d'un transgène du REpo qui permet son expression exclusive dans la lignée hématopoïétique ¹¹². Malgré le manque d'expression du REpo dans les tissus non-hématopoïétiques, ces souris invalidées pour le REpo sont normales, ce qui attribue la létalité embryonnaire uniquement à la fonction hématopoïétique de l'Epo.

Le REpo appartient à la famille de récepteur de cytokine de type I, caractérisée par un domaine transmembranaire unique et un domaine cytoplasmique sans domaine kinase ¹¹³. Le REpo existe déjà à l'état dimérique lorsqu'il n'est pas lié à son ligand. Lors de la fixation de l'Epo, le récepteur subit un changement conformationnel qui permet la transphosphorylation et l'activation de la tyrosine kinase cytoplasmique, Janus kinase 2 (JAK2) ¹¹⁴. JAK2 est absolument nécessaire pour l'activation du REpo et des souris invalidées pour JAK2 ont un phénotype presque identique aux souris invalidées pour REpo, avec une létalité embryonnaire ^{115,116}.

JAK2 activée par sa phosphorylation sur la Y1007 stimule ensuite deux voies de signalisation distinctes. D'abord, il existe la voie « JAK2 only » décrite ci-dessous. D'autre part, JAK2 induit la phosphorylation de 8 résidus tyrosine dans le domaine cytoplasmique du REpo, devenant ainsi des sites de fixation pour les molécules de signalisation contenant des domaines SH2 tels que STAT5a/b, SHP1, SHP2, SHIP, p85a, Grb2, Lyn et les régulateurs négatifs de la signalisation (SOCS) (figure 9). Les rôles respectifs physiologiques de cascades de signalisation initiées par la phosphorylation du REpo dans la régulation de l'érythropoïèse normale et de « stress » restent à élucider. Cependant, la plupart des travaux montrent que certaines voies semblent avoir un rôle majeur, parmi lesquelles les voies de *signal transducer and activator of transcription 5* (STAT5), *Ras/mitogen-activated protein kinase* (MAPK) et PI3-K/Akt, ainsi que la tyrosine kinase Lyn, de la famille des kinases Src. D'autres molécules de signalisation liant le récepteur à l'Epo ont été identifiées, dont les tyrosines kinases Syk, Tec, PLC- γ , les protéines adaptateurs Shc, Cbl, Crkl, IRS-2 et Gab 1/2 et les facteurs d'échange nucléiques Sos et Vav.

Des mutations du REpo sont associées à la Polyglobulie, l'érythrocytose et l'érythroleucémie ^{116bis,117,118}.

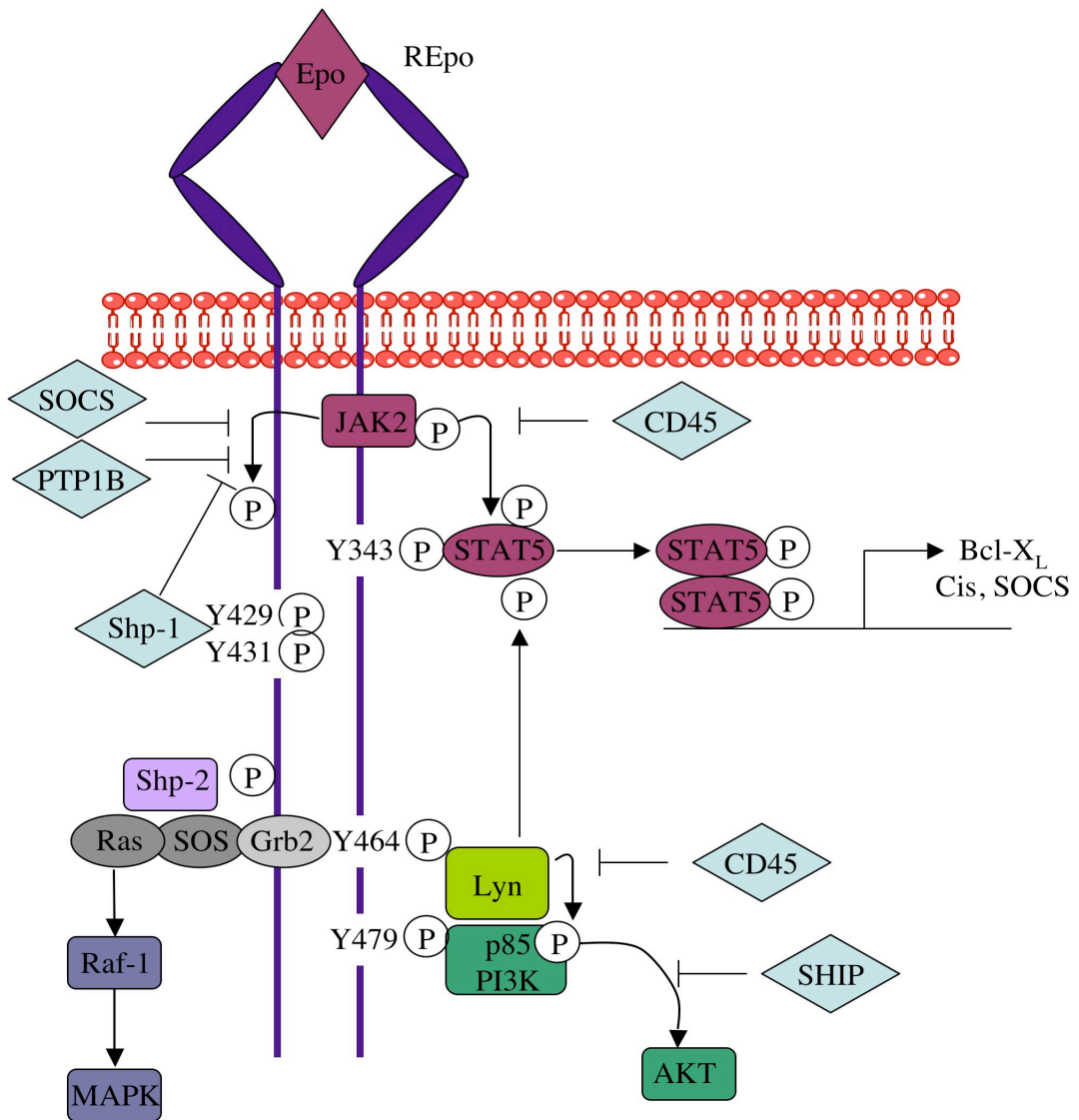


Figure 9 Voies de signalisation induites par le REpo en réponse à l'Epo.

L'activation de JAK2 associé au REpo par transphosphorylation induit l'activation du REpo par la phosphorylation via JAK2. JAK2 activé et Lyn coopèrent pour la phosphorylation de STAT5 induisant l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L. Les voies de signalisation Ras/Raf/MAPK et PI3K/AKT sont aussi activées. Les phosphatases CD45 et SOCS inhibent JAK2, la phosphatase Shp-1 inhibe la phosphorylation du REpo et SHIP inhibe la voie PI3K/AKT. (Adapté de Richmond et al, Trends in Cell Biology, 2005).

Voies de signalisations induites par Repo

La voie JAK2 only

Afin de discriminer les voies de signalisation induites par la voie JAK2/STAT5 des autres voies induites par le REpo, deux mutants du REpo ont été construits; le REpo HM, tronqué dans son domaine carboxy-terminal et déficient pour les 8 tyrosines cibles de phosphorylation et le REpo H qui est tronqué de la même manière mais dont la Y343

permettant la liaison de STAT5 au REpo est restaurée ^{118bis}. Le REpo HM est capable de soutenir une érythropoïèse basale chez la souris, générant des érythroblastes qui ont toutefois des capacités de survie et de prolifération réduites. Ce récepteur transmet alors un signal indépendant de STAT, d'AKT et JNK mais dépendant de JAK2 et de la voie Erk qui est dans ce cas hyper stimulée. Il est donc possible que ce récepteur tronqué utilise d'autres voies de signalisation qu'il reste à identifier ^{118ter}. Par analyse transcriptionnelle d'érythroblastes de souris exprimant le REpo H ou REpo HM, il a été montré que l'axe « *JAK2 only* » induit la diminution d'expression de molécules pro-apoptotiques telles que Bim, foxo3A et Trb2 ¹³⁶ (figure 10).

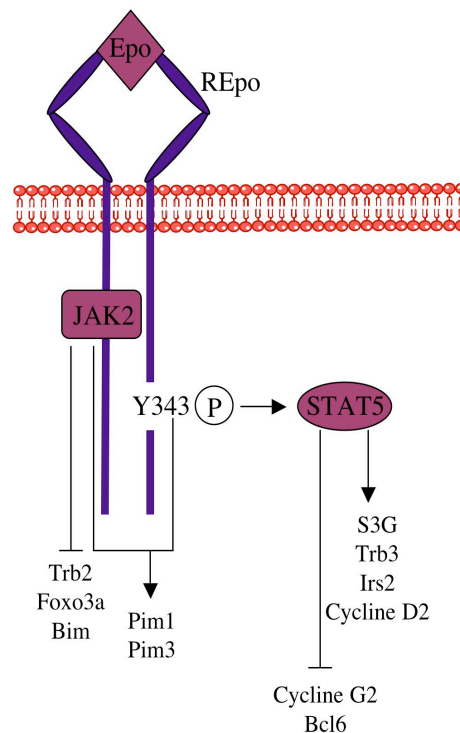


Figure 10 L'axe « JAK2 only »

L'axe « *JAK2 only* » inhibe l'expression de Trb2, Foxo3a et Bim. En parallèle, l'axe JAK2/PY343/STAT5 induit l'expression de Pim1, Pim3 et l'Epo permet l'induction S3G, Trb3, Irs2, Cyclin D2 et inhibe la Cycline G2 ainsi que Bcl6. (Daprès Sathyanarayana et al, Blood, 2008).

La voie Jak2/STAT5

La stimulation par l'Epo induit la phosphorylation de JAK2 qui est temps et dose dépendante ¹¹⁴. Toutes les kinases JAK ont sept domaines uniques appelés JAK-homology (JH) domaines (figure 11). Un domaine tyrosine kinase actif (JH1) et un domaine pseudokinase (JH2) qui peut jouer un rôle de régulation négative, sont situés en C-terminal ¹¹⁹. Toutes les kinases JAK contiennent un motif di-tyrosine dans la boucle d'activation. Plusieurs tyrosines de JAK2 ont un rôle dans sa régulation enzymatique et son activité de

phosphorylation de substrats. Ainsi, la Y1007 est nécessaire pour son activité tyrosine kinase¹²⁰. La phosphorylation de Y221 régule positivement JAK2 alors que la phosphorylation de Y570 diminue son activité kinase. JAK2 phosphoryle préférentiellement les substrats ayant un motif consensus Yxx(L/I/V)^{121,122}.



Figure 11 Représentation schématique de la protéine JAK2

Les sept domaines de JAK2 sont indiqués. Le domaine JH1 a une fonction de domaine kinase, le domaine JH2 a une fonction de domaine pseudokinase. Les résidus tyrosines (Y221 Y570, Y1007 et Y1008) impliqués dans la régulation de l'activité de JAK2 sont indiqués. (D'après Richmond et al, Trends in Cell Biology, 2005).

Bien que JAK2 phosphoryle STAT1¹²³ et STAT3¹²⁴ qui peuvent jouer un rôle dans l'érythropoïèse de stress, les cibles principales de JAK2 pour l'érythropoïèse basale sont les isoformes STAT5a et STAT5b^{125,109,126}. STAT5a et STAT5b sont deux isoformes de STAT5 qui partagent 90% d'homologies et font partie des sept membres de la famille des STAT caractérisée par leur double rôle de transduction du signal et de facteur de transcription. Ces protéines sont latentes dans le cytoplasme et peuvent, via un domaine SH2, se fixer sur la tyrosine Y343 phosphorylée du REpo ce qui induit leur phosphorylation, leur homodimérisation et l'activation des STAT5. Les homodimères activés de STAT5 migrent dans le noyau pour se lier à l'ADN et promouvoir l'activité des gènes de survie, prolifération et différenciation (figures 9 et 10).

Il semble que la voie STAT5 ne soit pas essentielle pour l'érythropoïèse basale car les souris déficientes pour STAT5a et b sont viables^{127,128}. Cependant, il a été montré que ces souris souffrent d'une anémie foetale et une augmentation de l'apoptose des érythroblastes liés à un défaut d'expression de Bcl-X_L^{129,130,128}. De plus, les progéniteurs érythroïdes des souris REpo HM montrent un retard de la différenciation érythroïde et une augmentation de l'apoptose¹³¹ et l'expression constitutive de STAT5a hyperactif dans des érythroblastes de foie fœtal est suffisante pour rétablir le défaut de prolifération des érythroblastes de souris déficientes pour JAK2 ou le REpo en induisant le renouvellement et la différenciation des progéniteurs en l'absence d'Epo¹³². Le rôle anti-apoptotique de STAT5 dans la signalisation du REpo est probablement médié, en partie, par son induction directe de Bcl-X_L dans les

cellules érythroïdes ¹²⁹. La région promotrice de Bcl-X_L contient des sites de fixation pour STAT5 ¹³³ et GATA-1 ¹³⁴ qui peuvent agir de manière synergique pour réguler positivement son activité ¹²⁹. L'expression exogène de Bcl-X_L humain induit une différenciation indépendante d'Epo dans des érythroblastes sauvages murins, indiquant que l'expression de Bcl-X_L peut à elle seule permettre la différenciation érythroïde sans l'activation d'autres voies de signalisation ¹³⁵. L'effet anti-apoptotique de STAT5 est médié par Bcl-X_L, mais aussi par la stimulation de molécules anti-apoptotiques telles que les sérine/thréonine kinases Pim1 et Pim3, Irs2, serpin-3G et la pseudokinase Trb3 ¹³⁶ (figure 10). Des études sur des souris déficientes pour STAT5a/b confirment ce rôle de STAT5 dans l'érythropoïèse de stress chez la souris adulte. En effet, les progéniteurs érythroïdes déficients pour STAT5a/b montrent un niveau d'apoptose élevé et sont moins sensibles à l'Epo ¹²⁹. Les souris qui expriment le REpo HM souffrent d'anémie sévère et persistante alors que l'expression du REpo H rétablit l'expansion des érythroblastes et l'induction de Pim1 via STAT5 lors de l'érythropoïèse de stress ¹³⁷.

L'introduction d'une forme dominante négative de STAT5 dans des progéniteurs érythroïdes adultes induit l'arrêt de prolifération et l'apoptose des cellules érythroïdes ¹³⁸. En effet, outre son effet sur la survie, l'Epo a un rôle direct sur la prolifération en induisant des facteurs de progression de cycle cellulaire tels que *nuclear protein 1* (Nupr1), *G1 to S phase transition 1* (Gspt1), *early growth response 1* (Egr1), *Ngfi-A binding protein 2* (Nab2) et la cycline D2 et aussi en inhibant les inhibiteurs du cycle tels que *inhibitory cyclin G2*, p27/Cdkn1b et *B-cell leukemia/lymphoma 6* (Bcl6). L'effet répressif sur la cycline G2 et Bcl6 et l'effet inducteur sur la cycline D2 sont dépendants de la tyrosine 343 (et STAT5) du REpo ¹³⁹ (figure 10).

Les voies Lyn et Src

Lyn et Src font partie de la famille des Src kinases qui compte huit membres. La protéine c-Src est ubiquitaire bien que son niveau d'expression soit plus élevé dans les plaquettes, les neurones, et les ostéoclastes ¹⁴⁰. Lyn est exprimée dans les neurones, les lymphocytes B et principalement dans les cellules hématopoïétiques myéloïdes (macrophages, monocytes et plaquettes) ¹⁴¹, ^{141bis} et aussi dans les érythrocytes où Lyn est impliquée dans la transduction du signal du REpo ^{142,143,144}. La protéine Lyn comprend deux isoformes, p53Lyn et p56Lyn, résultant d'un épissage alternatif ¹⁴⁵. Lyn possède deux tyrosines régulatrices de son activité. En effet, Lyn oscille entre une conformation inactive, due à la phosphorylation du résidu Y508 C-terminal et une conformation ouverte active caractérisée par l'autophosphorylation de la Y397 dans le domaine catalytique (avec au

préalable l'intervention de la phosphatase CD45 qui déphosphoryle le résidu Y508) ^{141bis}.

Des études ont montré que Src et Lyn sont activées par le REpo et sont importantes en tant que kinase secondaire pour la signalisation de REpo. La plupart des études chez la souris montrent un rôle de la kinase Lyn dans la différenciation érythroïde ^{146,147,148,149} alors qu'il s'agit plus souvent de la kinase Src chez l'homme ^{150,151,152}. Cependant, une étude montre que Lyn est aussi impliquée dans la maturation érythroïde chez l'homme ¹⁵³.

L'altération de Lyn entraîne des effets majeurs sur la différenciation érythroïde. En effet, la lignée murine J2E-NR déficiente pour Lyn montre un défaut de différenciation en réponse à l'Epo ¹⁴⁶, et l'expression de GATA-1, EKLF et STAT5a est diminuée dans cette lignée ¹⁴⁷. De la même manière, les érythroblastes de souris déficientes pour Lyn n'expriment pas GATA-1, EKLF et l'expression de STAT5a /b est diminuée et l'érythropoïèse de stress est fonctionnelle puisque les BFU-Es et CFU-Es augmentent dans la rate ¹⁴⁷. L'inactivation sélective de Lyn et pas de JAK2 dans des érythroblastes humains entraîne l'arrêt de maturation au stade d'érythroblaste basophile ¹⁵³. Il semble que les Src kinases soient impliquées dans l'activation de STAT5. En effet, dans des lignées hématopoïétiques dépendantes de l'Epo, Lyn s'associe au REpo sur les tyrosines phosphorylées 464 et 479 du récepteur et induit la phosphorylation sur la tyrosine 694 de STAT5, induisant son activité transcriptionnelle ¹⁵⁴ (figure 9). Dans la lignée érythroleucémique humaine K562 et dans d'autres lignées hématopoïétiques dépendantes de l'Epo, Src est aussi impliquée dans la phosphorylation de STAT5 suite à la stimulation par l'Epo ¹⁵⁰. D'autre part, dans la lignée, K562, l'inhibition de l'expression de Src induit la diminution de la maturation de K562 sous Epo ¹⁵¹. Des études dans la lignée FDC-P1 transfectée avec le REpo suggèrent un rôle de Lyn dans l'activation de la PI3-K induite par l'Epo ¹⁵⁵. Le rôle de Src dans la différenciation des K562 sous Epo semble lié à la capacité de Src d'activer la PI3-K via la liaison de la PI3-K au REpo phosphorylé par Src ¹⁵². Cependant, une augmentation du niveau de phosphorylation d'AKT est observée dans les érythroblastes de souris Lyn^{-/-}, les auteurs suggèrent que ce mécanisme pourrait être le reflet de la mise en place d'une réponse compensatoire aux défaut de croissance et de survie ¹⁴⁸.

Outre son effet sur la différenciation, Lyn a également un rôle prolifératif. Lyn permet la prolifération des progéniteurs précoces Kit^{pos}CD71^{high}, puis à un stade plus tardif, permet la survie et la maturation des érythroblastes Ter119^{pos}, probablement via Bcl-X_L ¹⁴⁸. Récemment, il a été montré que la surexpression de Lyn dans des cellules de souris transgéniques spi-1, permettant la prolifération de CFU-E arrêtés dans la différenciation, induit la diminution d'expression de c-Kit ¹⁴⁹. Cette étude souligne le rôle double de Lyn comme effecteur positif

de Lyn dans la signalisation de l'Epo et comme effecteur négatif dans la signalisation du SCF.

La voie PI3-K/AKT

L'Epo stimule la survie cellulaire et la prolifération par l'activation de la PI3-K constituée de la sous-unité régulatrice p85 et de la sous-unité catalytique p110 (figure 9). La sous-unité p85 est directement recrutée par le REpo phosphorylé sur tyrosines, et aussi indirectement par l'interaction avec un membre de la famille des petites GTPases telle que Ras. La seconde étape consiste en la génération de 3'-*phosphorylated inositol lipid* (PIP₃) qui lie la sérine/thréonine kinase PKB/AKT entraînant son activation. L'activation de la PI3-K est nécessaire, mais pas suffisante, pour la protection contre l'apoptose ¹⁵⁶. Les souris qui n'expriment pas la sous-unité p85 de la PI3-K montrent une diminution du nombre de précurseurs BFU-Es et CFU-Es ¹⁵⁷ (figure 12).

PKB/AKT activé va induire des effets anti-apoptotiques en phosphorylant des composants de la machinerie de l'apoptose comme le facteur de transcription *forkhead box O3A* (Foxo3a) ou FKHR-L1 qui est majeur pour l'érythropoïèse ^{158,159}. L'activité transcriptionnelle de FKHR-L1 est inhibée par phosphorylation résultant en sa rétention cytoplasmique par les protéines 14-3-3. Les souris déficientes pour foxo3a souffrent d'une anémie régénérative, indiquant un rôle de FKHR-L1 dans la régulation de la différenciation érythroïde ¹⁵⁹. Les cibles de FKHR-L1 sont : *B cell translocation gene 1* (BTG1) qui a un rôle anti-prolifératif ¹⁶⁰; l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{KIP1} ¹⁶¹; les gènes apoptotiques tels que FasL et Bim ¹⁶². La voie PKB/AKT permet aussi la survie par la phosphorylation et l'inactivation de la protéine pro-apoptotique Bad et la maintenance de l'intégrité de la membrane mitochondriale; l'augmentation de la transcription de gènes de survie par l'activation des facteurs de transcription NF-κB et CREB ^{163,164,165}. De plus, la voie PKB/AKT est impliquée dans la régulation positive de l'expression de la survivine (un membre de la famille des protéines inhibiteurs d'apoptose (IAP)) ¹⁶⁶. Une autre cible de la voie PKB/AKT est la sérine/thréonine kinase *glycogen synthetase kinase-3* (GSK3), impliquée dans le métabolisme du glycogène et dans la régulation de l'apoptose des progéniteurs érythroïdes humains primaires. L'activité de GSK3 est inhibée par l'Epo et aussi le SCF et son inhibition par un inhibiteur chimique protège les progéniteurs érythroïdes de l'apoptose induite par la privation en Epo ¹⁶⁷ (figure 12).

Bien que le mécanisme d'action ne soit pas encore bien connu, la voie PI3-K/AKT semble être impliquée dans la différenciation érythroïde. En effet, l'inhibition de cette voie dans une culture de CD34+ cultivées en présence d'Epo et de SCF diminue l'apparition de cellules GPA positives ¹⁶⁸. L'expression d'AKT activé permet la différenciation érythroïde de

progéniteurs de foie fœtal sauvages ou déficients pour JAK2¹⁶⁹. Cet effet de la voie la PI3-K/AKT sur la différenciation érythroïde est probablement en partie lié à la phosphorylation de la sérine 310 de GATA-1 par AKT, ce qui augmente son activité transcriptionnelle⁵⁶ (figure 12).

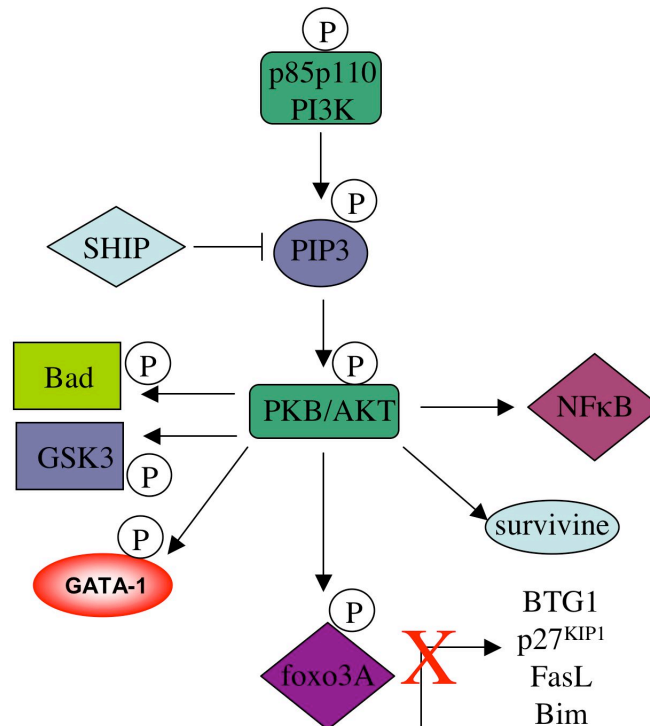


Figure 12 Représentation schématique de la voie de transduction PI3-K/AKT

L'activation de la PI3-K résulte en la phosphorylation de PKB/AKT. La phosphorylation par PKB/AKT de foxo3a diminue son activité transcriptionnelle ; la phosphorylation de Bad et GSK3 les inactive , la phosphorylation de GATA-1 et NFB augmente leur activité transcriptionnelle. La voie PKB/AKT permet l'expression de la survivine.

La voie des MAPK

L'Epo active la voie Ras, soit directement par la protéine adaptateur cytoplasmique Grb2 qui se lie directement à la tyrosine 464 du REpo, soit indirectement, via la tyrosine phosphatase SHP2^{170,171} ou SHC/SHIP-1¹⁷² (figure 9). Ces mécanismes entraînent la translocation de SOS, un facteur d'échange, vers Ras, ce qui induit son activation. L'activation de Ras est essentielle pour la différenciation, la prolifération et la survie des progéniteurs érythroïdes *in vitro*. Chez les mammifères, il existe 3 protéines homologues de Ras, H-Ras, N-Ras et K-Ras. Au cours de l'érythropoïèse, seule K-Ras est essentielle pour la différenciation des progéniteurs érythroïdes jusqu'au stade d'érythroblastes basophiles et pour la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques¹⁷³. L'activation de Ras induit l'activation

de Raf-1 et finalement des MAP kinases et de gènes précoces tels que c-fos, c-myc, c-jun.

L'Epo induit l'activité catalytique de plusieurs MAP kinases dont Erk1/2 (*extracellular-regulated kinases 1/2*)¹⁷⁴, SAP kinase (SAPK)/Jun kinase (Jnk) et p38. Erk1/2 participerait à la mitogénèse alors que le rôle de SAPK/JNK et p38 est plus complexe et serait décrit initialement dans la réponse au stress.

La voie de signalisation d'Erk1/2 est impliquée dans les phases de prolifération précoces de l'érythropoïèse et dans l'inhibition de la différenciation terminale érythroblastique permettant ainsi l'expansion des progéniteurs¹⁷⁵.

JNK est une sérine/thréonine kinase qui phosphoryle le facteur de transcription c-Jun et induit son activité transcriptionnelle au sein du complexe *activator protein-1* (AP1). AP1 est impliqué dans le cycle cellulaire et dans la régulation positive et négative de l'apoptose. Le complexe AP1, particulièrement celui contenant Jun-B, est impliqué dans l'apoptose induite par la privation en facteur de croissance. Au contraire, le complexe AP1 contenant c-Jun activé est impliqué dans la répression de l'apoptose dans les cellules dépendantes de facteurs de croissance et l'induction de c-Jun retarde l'apoptose induite dans les cellules érythroïdes. L'activité de JNK semble jouer un rôle majeur dans la régulation de la prolifération des cellules érythroïdes immatures primaires ou issues de lignées, mais n'est pas nécessaire pour la survie ou la prolifération des CFU-Es et des proérythroblastes¹⁷⁶.

Les souris invalidées pour p38 souffrent d'une anémie fœtale fatale. Ce phénotype est lié à un défaut de régulation post-traductionnelle de l'ARNm de l'Epo¹⁷⁷. p38 ne semble pas jouer de rôle dans la régulation de l'apoptose induite par la privation en Epo dans la lignée HCD57¹⁷⁸. Cependant, la voie de signalisation p38/MAPK semble jouer un rôle critique dans la différenciation, notamment lors de la différenciation induite par le butyrate de la lignée K562¹⁷⁹ ou lors de la différenciation sous Epo des cellules murines érythroleucémiques SKT6¹⁸⁰ et des érythroblastes primaires. L'activation de p38 par phosphorylation est augmentée au cours de la différenciation érythroïde terminale humaine et est accompagnée de l'augmentation de la phosphorylation d'Hsp27¹⁸¹.

Bruton tyrosine kinase

La Bruton tyrosine kinase (Btk) a récemment été décrite comme jouant un rôle dans l'érythropoïèse. Cette protéine, qui fait partie de la famille des tyrosines kinases cytoplasmiques Tec, est classiquement étudiée dans la lignée lymphocytaire B où elle joue un rôle dans la sensibilité à l'apoptose¹⁸². En effet, les patients ayant un déficit ou une mutation

de Btk présentent une agammaglobulie liée à l'X causée par un blocage dans le développement des cellules B¹⁸³. Btk a été classiquement décrit comme en étant en aval de la voie de la PI3-K. C'est pourquoi son rôle a été étudié dans l'érythropoïèse notamment dans le cadre de la signalisation de c-Kit¹⁸⁴. Il a par la suite été montré que Btk s'associe avec le REpo et JAK2 et qu'elle peut être phosphorylée par JAK2¹⁸⁵. Les patients déficients pour Btk et les souris Btk^{-/-} ne présentent pas de défaut d'érythropoïèse basale. Cependant, il a été montré dans ces souris KO, que les progéniteurs érythroblastiques ont une croissance limitée en condition sous-optimale d'Epo et de SCF et présentent une diminution de phosphorylation du R-Epo et de JAK2¹⁸⁵. L'équipe de Von Lindern propose un modèle dans lequel Btk a une action différente selon sa phosphorylation en aval du R-Epo ou de c-Kit. En effet, le SCF induirait la phosphorylation de Btk qui s'associerait avec le récepteur TRAIL protégeant ainsi les progéniteurs érythroïdes de l'effet antiprolifératif de TRAIL. Par contre, la stimulation par l'Epo permettrait l'amplification des voies de signalisation de l'Epo dont STAT5 et PLC^{185,186}.

Phosphatases et kinases impliquées dans la régulation négative de la signalisation du REpo

La phosphorylation du récepteur de l'Epo est transitoire et revient à un état basal en environ 30 minutes. Le REpo est en effet rapidement déphosphorylé par plusieurs systèmes impliquant des tyrosine phosphatases qui modulent l'activité de JAK2: *cluster differentiation 45* (CD45) et la *protein tyrosine phosphatase 1B* (PTP-1B)¹⁸⁷ et la phosphatase à domaine SH2 Shp-1 (figure 9). Les progéniteurs érythroïdes de souris déficientes pour Shp-1 sont hypersensibles à l'Epo ou ont une croissance indépendante à l'Epo¹⁸⁸. Shp-1 se lie par son domaine SH2 au REpo phosphorylé sur les tyrosines 429 et 431 et inhibe l'activation de JAK2 en le déphosphorylant¹⁸⁹. L'inactivation de Lyn est médiée par la phosphatase transmembranaire CD45¹⁵³.

Une autre famille de protéines impliquées dans l'extinction du signal du REpo est celle des *suppressors of cytokine signalling* (SOCS) : SOCS1, CIS (*cytokine-induced SH2 containing protein*) et SOCS3. Ces protéines sont activées par les STAT suite à la stimulation par l'Epo^{190,191}. SOCS1 et 3 inhibent la phosphorylation du REpo et l'activation de STAT5 en inhibant l'activité de JAK2, CIS initie la dégradation protéasomale du REpo¹⁹².

Parmi les phosphatases, on peut également citer les phosphatases d'inositols telle que SHIP-1 (*SH2-inositol phosphatase*) qui se fixent directement au récepteur¹⁷² et déphosphoryle *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate* (PtdIns(3,4,5)P3)¹⁹³. Les souris déficientes pour SHIP-1 ont une diminution du nombre de BFU-Es, CFU-Es dans la moelle

¹⁹⁴.

Récemment, le rôle dans la régulation négative de l'érythropoïèse de stress de deux kinases DIRK3 et DAPK2, phosphorylées et activées en réponse à l'Epo, a pu être mis en évidence. L'invalidation du gène DIRK3 accroît de façon importante la production de réticulocytes et protège de l'anémie¹⁹⁵. La kinase DAPK2 est exprimée tardivement au cours de la maturation et pourrait exercer une fonction pro-apoptotique sur les érythroblastes¹⁹⁶.

3.3 Coopération entre le SCF et Epo.

Bien que le SCF induise la prolifération et la survie des progéniteurs érythroïdes, son effet est fortement amplifié en combinaison avec l'Epo. En effet, il existe une interaction physique entre c-Kit et REpo via la région cytoplasmique box2 du REpo⁸⁰. De plus, la stimulation de progéniteurs érythroïdes de la lignée HCD-57 (une lignée érythroleucémique dépendante de l'Epo et qui exprime fortement c-Kit) avec le SCF seul permet la prolifération, la survie et induit la phosphorylation du REpo^{80,197,198}. Le SCF permet la prolifération de la lignée 32D uniquement si ces cellules co-expriment c-Kit et REpo^{80,199}. En outre, dans les cellules de foie fœtal invalidées pour le REpo, l'expression de mutants de REpo permet la formation de CFU-Es uniquement si les voies du REpo et de c-Kit sont stimulées¹⁹⁹. Une autre étude dans la lignée UT7 a montré que l'Epo induit la phosphorylation sur tyrosine de c-Kit²⁰⁰.

Il apparaît que les résidus tyrosines 567 et 569 de c-Kit jouent un rôle essentiel dans la régulation de la phosphorylation du REpo et dans la synergie entre c-Kit et REpo des cellules érythroïdes (Tan JBC 2003 ; Hong cellular signalling 08). En effet, lorsque c-Kit est muté pour ces deux tyrosines, l'activation des Src est abolie et c-Kit ne coopèrent pas avec le REpo pour permettre la survie et la prolifération de progéniteurs de lignées ou de CFU-E primaires en réponse à la co-stimulation de c-Kit et du REpo^{100,202}. La restauration des résidus 567 et 569 en tyrosines de c-Kit muté pour les sept résidus tyrosines impliqués dans la signalisation, permet de retrouver la synergie entre c-Kit et le REpo^{100,201,202}.

Des mutants de c-Kit ne permettant pas l'activation de la PI3-K (Y719F), PLC-(Y728F), Grb2 (Y702F) ou Grb7 (Y934F) ont un effet moindre sur la diminution de la prolifération et la survie des progéniteurs suite à la co-stimulation de c-Kit et du REpo¹⁰⁰. Dans une population homogène de proérythroblastes primaires humains dont la survie et la prolifération dépendent de l'effet combiné du traitement du SCF et de l'Epo, il a été montré que la phosphorylation d'AKT est observée suite au traitement par le SCF et non par l'Epo et

que l'inhibition de la voie PI3-K induit la diminution de la prolifération des proérythroblastes stimulés par l'Epo et le SCF²⁰³. Ce résultat est surprenant puisqu'il est connu que l'Epo active aussi la voie PI3-K/AKT. En effet, l'inhibition de la voie PI3-K par l'inhibiteur chimique LY294002 supprime fortement l'érythropoïèse induite par l'Epo seule ou l'action combinée de l'Epo et du SCF en diminuant la survie, bloquant les proérythroblastes en G0/G1 et diminuant le nombre de cellules GPA positives¹⁶⁸.

Bien que le SCF induise la phosphorylation du REpo dans les cellules érythroïdes primaires humaines, ce n'est pas suffisant pour transmettre le signal par le REpo pour permettre la survie et la prolifération¹⁷⁵. En effet, le SCF et l'Epo activent de manière synergique la voie MAPK (ERK1/2) qui pourrait permettre la survie et la croissance en réponse à la co-stimulation par le SCF et l'Epo. De plus, l'inhibition des voies de signalisation MAPK et PI3-K inhibe l'action synergique des MAPK et la croissance érythroïde^{175,203}. Il semble que le SCF induise les MAPK par une voie différente de l'Epo puisque les MAPK induites par l'Epo mais pas par le SCF sont inhibées par la wortmannin¹⁷⁵.

Dans les cellules G1E-ER2 (dérivées de cellules souches embryonnaires invalidées pour GATA-1, exprimant seulement les gènes érythroïdes et qui prolifèrent à un stade arrêté de leur différenciation) il a été montré que la stimulation de c-Kit par le SCF joue un rôle essentiel dans l'expression du REpo et de STAT5, induisant ainsi l'augmentation de l'expression de Bcl-X_L et la survie des progéniteurs érythroïdes. Par contre, l'activation de STAT5 est dépendante du REpo uniquement et pas de c-Kit²⁰⁴. De même, dans la lignée érythroleucémique HCD-57¹⁹⁷ et dans les précurseurs érythroïdes primaires humains²⁰³, la phosphorylation et l'activation de STAT5 est médiée par l'Epo mais pas par le SCF. Dans les cellules HML/SE il a été montré que l'ARNm de l'Epo augmente en réponse à la stimulation par le SCF²⁰⁵.

Il existe donc différents mécanismes de synergie entre c-Kit et le REpo dans la régulation normale de l'érythropoïèse avec un rôle majeur des Src, de la voie PI3-K/AKT, des MAPK (ERK1/2) et de STAT5 (figure 13).

La phosphorylation des tyrosines du REpo n'intervient pas dans la co-signalisation entre le REpo et c-Kit. En effet, des études utilisant un REpo tronqué de toutes ces tyrosines et muté pour la Y343, suggèrent que la queue cytoplasmique du REpo n'est pas impliquée dans la contribution de l'effet synergique entre c-Kit et le REpo, puisque ce REpo tronqué et muté pour la Y343 permet une synergie avec c-Kit quasi comparable à celle du REpo sauvage

206,201,202

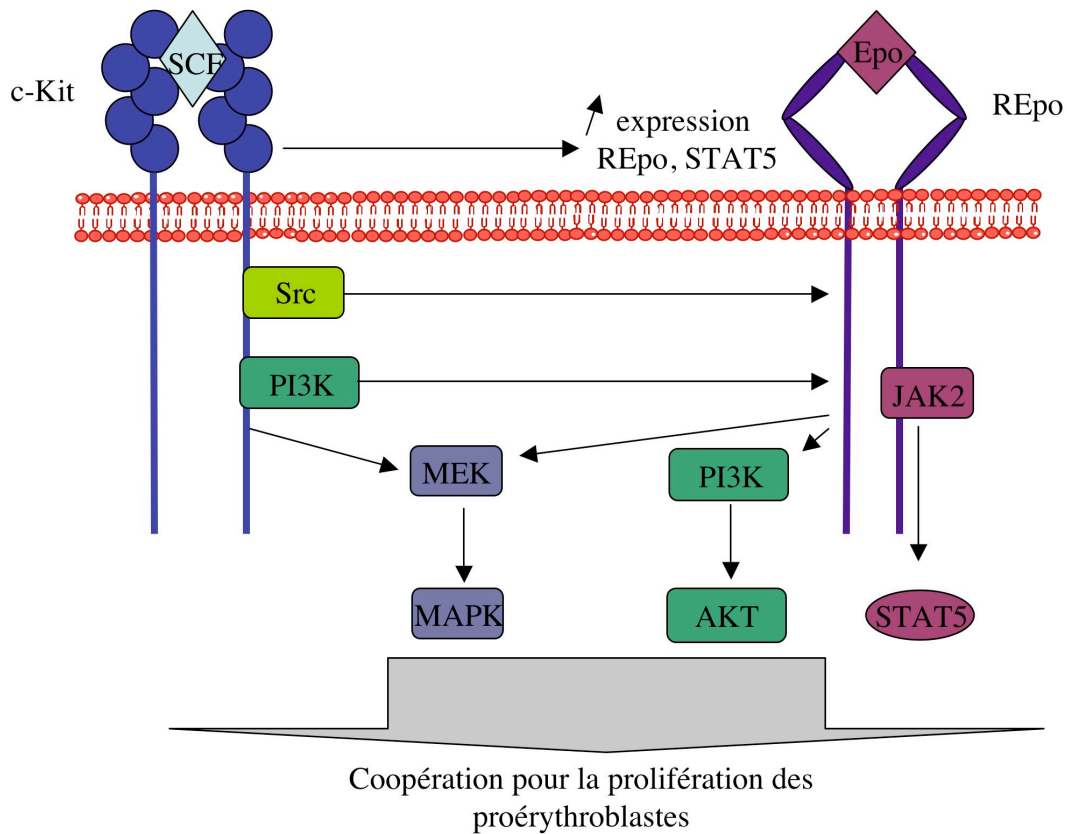


Figure 13 Schéma représentant le coopération entre c-Kit et REpo pour la prolifération des proérythroblastes en réponse au SCF et à l'Epo.

L'Epo induit l'activation de la voie JAK2/STAT5 et le SCF de la voie des Src kinases. Les voies des MAPK et PI3-K/AKT sont activées en réponse aux deux facteurs de croissance. L'inhibition d'une de ces voies de signalisation résulte en la suppression de la coopération pour la prolifération des proérythroblastes en réponse au SCF et à l'Epo. (Adapté de Murat et al, British Journal of Haematology, 2005).

4 Régulation négative de l'érythropoïèse par l'apoptose

Bien que la production quotidienne d'érythrocytes soit finement régulée, la perte de sang due à un saignement ou l'hémolyse requiert une augmentation de la production d'érythrocytes rapide. Afin d'éviter une polyglobulie, le nombre d'érythrocytes produits est régulé négativement, notamment par l'apoptose. Celle-ci peut être induite par deux voies :

-la voie intrinsèque, aussi appelée voie mitochondriale, activée lors de la diminution taux d'Epo circulant qui induit la baisse de Bcl-X_L.

-la voie extrinsèque, activée lors de la production élevée d'érythroblastes matures qui expriment FasL et activent la voie Fas des érythroblastes immatures.

4.1 Activation de la voie intrinsèque de l'apoptose par la diminution du taux d'Epo

L'Epo est le facteur régulateur principal de l'érythropoïèse. L'Epo est produite majoritairement par le rein et va agir au niveau de la moelle osseuse pour stimuler la production de globules rouges²⁰⁷. La production de globules rouges va amener de l'oxygène dans les cellules rénales qui vont alors diminuer leur synthèse d'Epo ce qui aura pour conséquence la diminution en retour de la production de globules rouges. Il existe donc à ce niveau une véritable régulation endocrine, le rein étant la « glande » productrice et la moelle osseuse l'organe cible (figure 14). Ainsi, il existe une relation inverse entre le taux d'hémoglobine et le taux d'Epo²⁰⁸. La concentration en Epo sérique est physiologiquement basse (5-30mU/ml) et une diminution de l'hématocrite résulte en l'augmentation du taux d'Epo sérique.

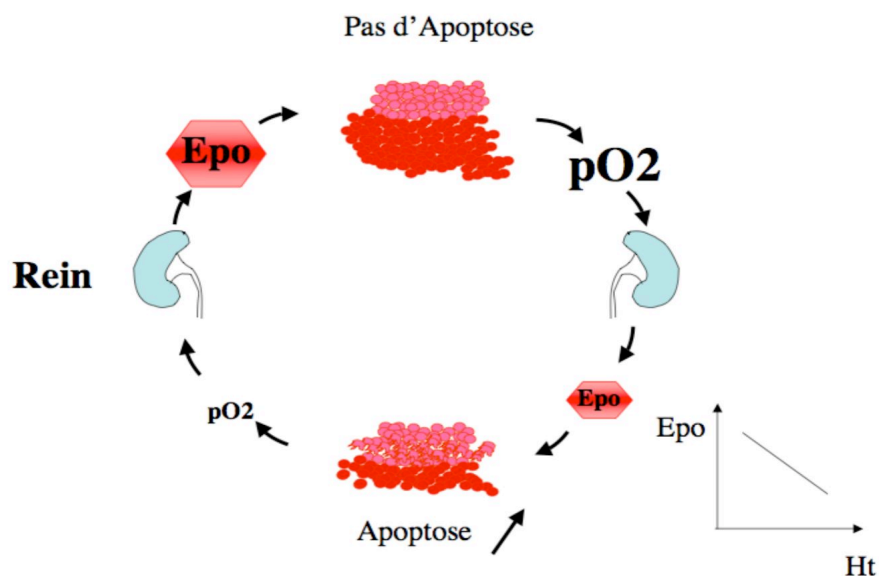


Figure 14 Régulation endocrine de l'érythropoïèse.

Les progéniteurs érythroïdes roses sont moins sensibles à l'Epo que les rouges qui meurent par apoptose à de faibles concentrations d'Epo. A droite, la relation entre le niveau d'Epo et l'hématocrite (Hct).

L'Epo est donc une hormone circulante qui gouverne la production de globules rouges. L'expression de l'Epo est induite par l'hypoxie et régulée par le facteur de transcription HIF-1 (*Hypoxia Inducible Factor-1*)^{209,210,211,212}. La régulation du taux d'Epo est régulée non pas par la production d'HIF-1 mais par sa dégradation qui est régulée par le protéasome. Donc, les cellules normoxiques ont suffisamment d'oxygène pour permettre l'hydroxylation d' HIF-1^{213,214,215,216,217} entraînant son ubiquitinylation par un complexe comprenant la protéine de von Hippel-Lindau (VHL), puis sa dégradation par le protéasome^{212,218}. Au contraire, dans les cellules hypoxiques, il n'y a pas assez d'oxygène pour ces réactions, HIF-1 n'est pas hydroxylé, pas dégradé et permet la transcription du gène de l'Epo.

En réponse à l'anémie ou à l'hypoxie, les taux circulants peuvent augmenter jusqu'à 1000 fois. A l'inverse, la diminution du taux d'Epo circulante induit la diminution de l'activation de STAT5 et donc de l'expression de Bcl-X_L. Ceci induit la dépoliarisation de la mitochondrie. En effet, l'intégrité de la polarité de la membrane mitochondriale dépend, au moins en partie, des niveaux d'expression des protéines pro (Bax, Bad, Bid) et anti-apoptotiques (Bcl-x_L, Bcl-2) de la famille Bcl-2²¹⁹. La dépoliarisation de la mitochondrie conduit à l'activation d'une famille de cystéines protéases, les caspases qui sont les enzymes exécutant le programme de mort cellulaire par apoptose. Les caspases sont synthétisées sous forme de pro-enzymes inactives. Les caspases « initiatrices » (caspase-8, caspase-9 et

caspase-10) activées par auto-clivage catalytique éliminant leur prodomaine, rendent fonctionnelles les caspases dites « exécuteurs » (caspase-3, caspase-6 et caspase-7) par protéolyse de leurs prodomaines respectifs.

Cette apoptose par la « voie mitochondriale » provoque la sortie dans le cytoplasme de la caspase-9 et du cytochrome *c*. Celui-ci va s'associer à Apaf-1, à l'ATP et va ainsi entraîner l'activation de la procaspase-9 en caspase-9 activée au sein de l'apoptosome. Cette dernière va cliver et activer la procaspase-3. D'autres molécules apoptotiques sont libérées de la mitochondrie : la flavoprotéine AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) qui déclenche les modifications nucléaires caspases-indépendantes^{220,221} et Smac (*Second Mitochondria Derived Activator of Caspase*, aussi appelé Diablo) qui active l'apoptose en neutralisant l'activité des IAPs (*Inhibitory Apoptotic proteins*) (figure 15).

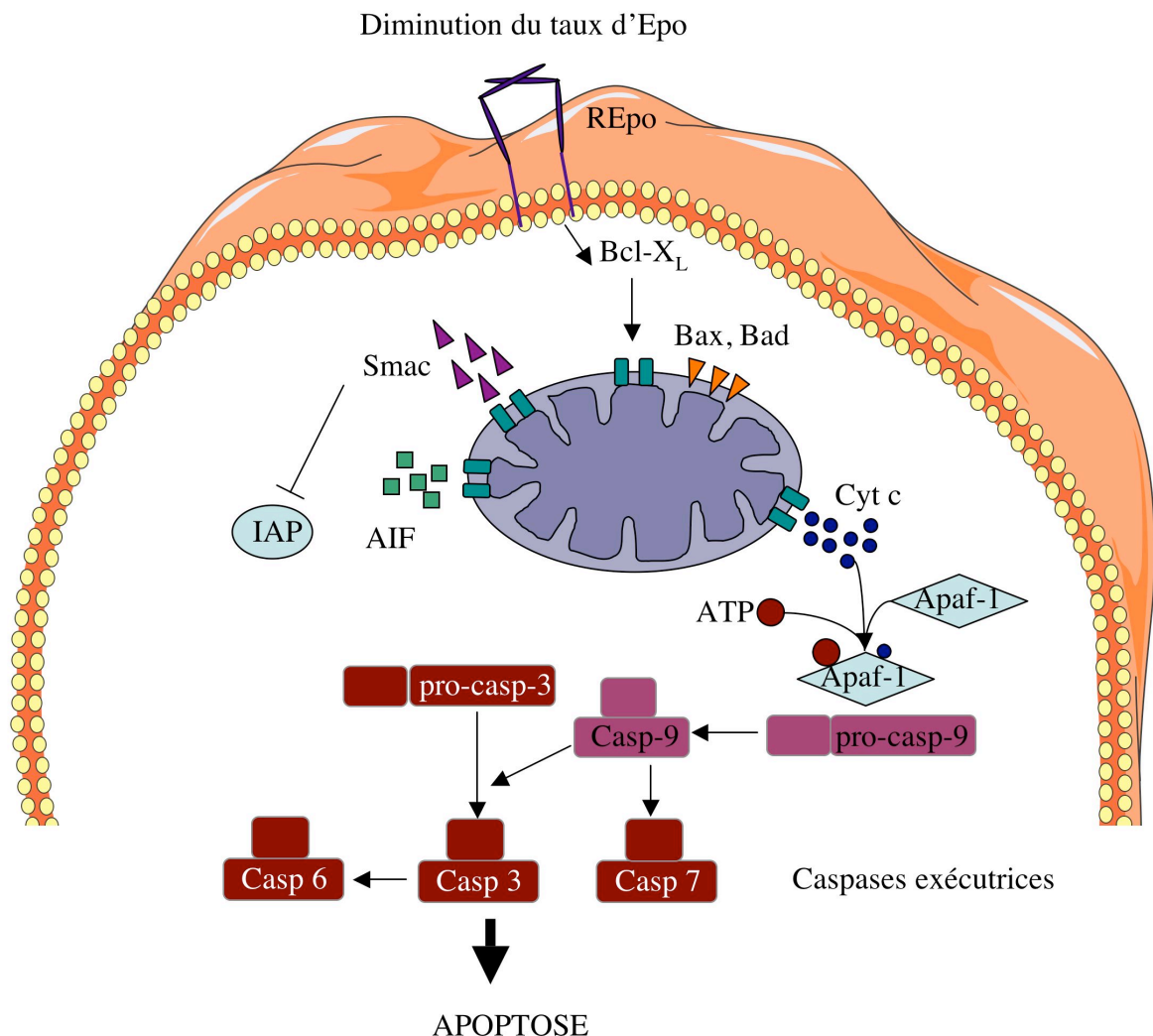


Figure 15 Voie intrinsèque de l'apoptose déclenchée par la diminution du taux d'Epo.

La diminution de la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L et les protéines pro-apoptotique Bax et Bad induisent la dépolarisation de la mitochondrie avec comme conséquence le relargage de cytochrome c (Cyt c) qui s'associe avec Apaf-1, l'ATP et la pro-caspase-9 au sein de l'apoptosome pour engendrer l'activation de la caspase-9. La caspase-9 entraîne l'activation de la caspase-3 et de la caspase-7. La caspase-3 entraîne l'activation de la caspase-6. AIF induit l'apoptose indépendante des caspases et Smac/Diablo inhibe les IAPs ce qui induit l'activation des caspases. (Adapté de la revue Testa et al., Leukemia, 2004).

4.2 Activation de la voie extrinsèque de l'apoptose par la liaison de FasL sur son récepteur Fas.

Il existe d'autre part, un rétro-contrôle négatif faisant intervenir le récepteur de mort Fas et son ligand FasL, qui appartiennent à la famille des récepteurs de mort (DR pour *Dead Receptor*) et des DR-Ligands respectivement. L'activation de Fas par son ligand permet l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose et à l'activation des caspases (figure 16). Ces récepteurs trimériques recrutent la molécule adaptatrice FADD et la pro-caspase-8 dans le *death-inducing signalling complex* (DISC). La caspase-8 clive directement la caspase exécutive, la caspase-3. La caspase-8 activée est aussi capable d'activer à son tour Bid par clivage. Bid clivé va entraîner l'activation des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 avec pour conséquence, le relargage de facteurs apoptotiques de la mitochondrie²²² (figure 16).

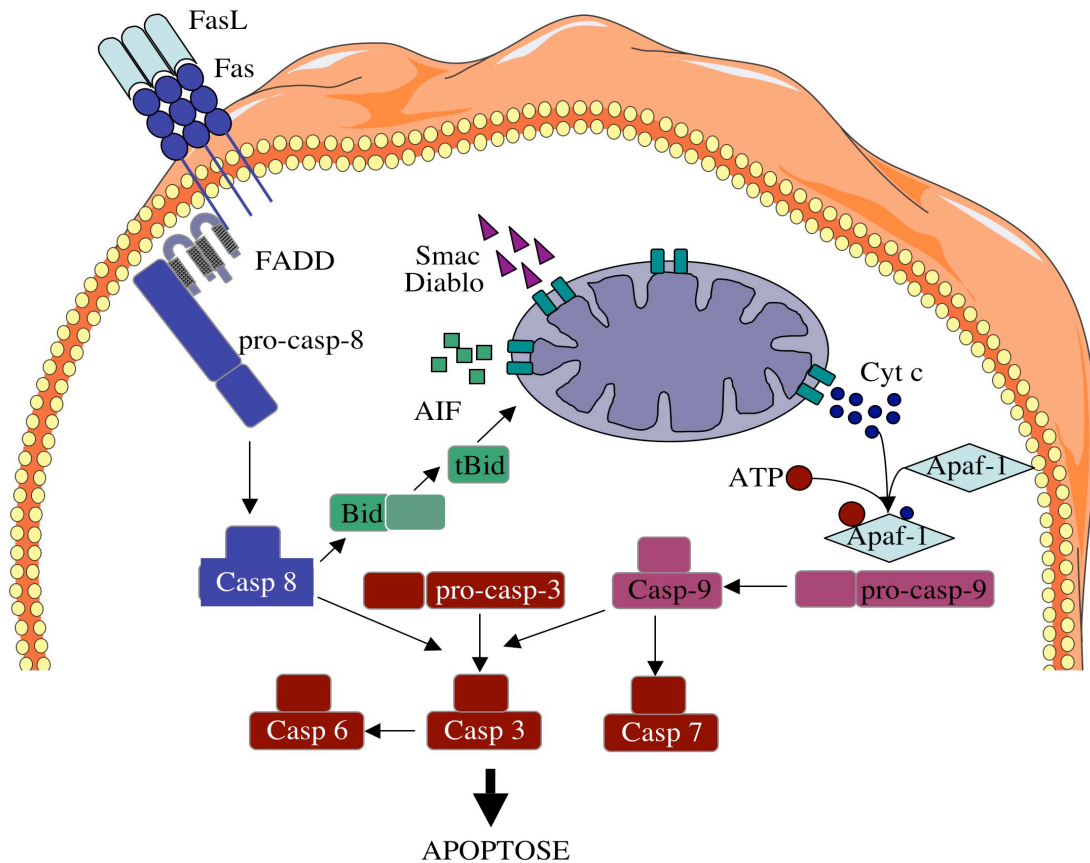


Figure 16 Voie extrinsèque de l'apoptose induite par la voie de Fas/FasL

La liaison de FasL sur Fas résulte en la formation d'un complexe contenant la protéine adaptatrice FADD qui recrute la pro-caspase-8. La caspase 8 activée entraîne d'une part l'activation directe de la caspase-3 et d'autre part le clivage et l'activation de Bid en *truncated Bid* (tBid) qui va induire la dépoléarisation de la mitochondrie et l'apoptose qui en découle. (Adapté de la revue Testa et al., Leukemia, 2004).

Dans la moelle osseuse, l'érythropoïèse se déroule au sein de l'îlot érythroblastique comprenant un ou deux macrophages entourés des anneaux d'érythroblastes à différents stades de maturation. La couche interne comprend des érythroblastes immatures alors que les cellules plus matures sont en périphérie de l'îlot. Cette association spatiale d'érythroblastes immatures et matures joue un rôle important dans l'érythropoïèse puisque des interactions cellules-cellules semblent nécessaires pour la prolifération et la maturation érythroïde ²²³. Cette structure permet aussi un système de régulation négative de la production des érythrocytes lorsque le nombre d'érythroblastes différenciés est suffisant. En effet, les érythroblastes matures (stade érythroblaste acidophile), qui expriment le ligand de Fas (Fas-L) à leur surface, vont induire, par contact cellulaire, l'apoptose et l'arrêt de maturation des précurseurs les plus immatures (stade érythroblaste basophile) qui expriment fortement Fas ²²⁴. L'interaction de Fas/Fas-L déclenche l'activation des caspases qui protéolysent le facteur de

transcription GATA-1, entraînant ainsi l'apoptose et/ou l'arrêt de maturation des érythroblastes immatures selon le taux d'Epo. En effet, en présence de concentration élevée d'Epo, Fas induit peu l'apoptose des érythroblastes immatures mais induit un blocage de la différenciation érythroïde alors qu'à de faible concentration en Epo, Fas induit l'apoptose ²²⁵. D'autre part, Le SCF protège les érythroblastes de l'apoptose induite par la voie Fas et ce, par un mécanisme dépendant des Src kinases. En effet, le SCF protège des progéniteurs érythroïdes humains de l'activation des caspases-3 et -8 induite par la voie Fas, sans diminuer l'expression de Fas. Cette protection de l'apoptose médiée par le SCF est levée par PP2, un inhibiteur de la famille des kinases Src ⁸².

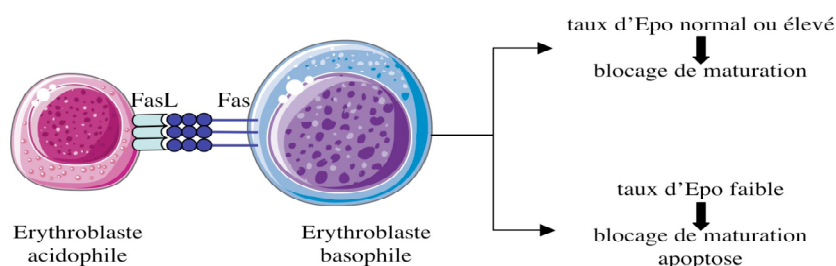


Figure 17 Régulation négative de l'érythropoïèse des érythroblastes matures qui expriment le FasL sur les érythroblastes immatures exprimant Fas.

Suite à cette interaction qui a lieu au sein de l'îlot érythroblastique, les érythroblastes basophiles subissent un arrêt de maturation en présence de niveau d'Epo normal ou élevé et ils arrêtent leur maturation puis meurent par apoptose si le taux d'Epo est faible. (D'après revue Testa Leukemia 2004).

Au cours de l'érythropoïèse de stress, les érythroblastes immatures de rate sont moins nombreux et meurent plus d'apoptose que les érythroblastes immatures de la moelle osseuse. En effet, les érythroblastes de la rate coexpriment Fas et FasL. A nouveau, cette régulation négative de l'érythropoïèse de stress est supprimée par l'Epo qui inhibe l'expression de Fas et FasL ²²⁶.

Outre son effet direct sur l'activation de la caspase-3, il a été montré que Fas inhibe la prolifération en exerçant un contrôle négatif sur l'activation de ERK et l'expression de Raf-1, permettant ainsi la différenciation érythroïde ²²⁷. De plus, il a récemment été mis en évidence un rôle non apoptotique de Fas dans l'érythropoïèse. En effet, l'activation des caspases-3,-8 et -9 induites par la voie Fas/FasL sont nécessaires pour la maturation érythroïde puisque l'inhibition de Fas ou des caspases-3,-8 et -9 par siRNA entraîne l'arrêt de différenciation érythroïde au stade proérythroblaste ²²⁸.

5 Rôles des caspases dans la différenciation terminale érythroïde

L'activation des caspases est donc le principal mécanisme moléculaire impliqué dans l'inhibition de l'érythropoïèse. Les caspases exécutrices vont alors cliver de nombreux substrats et en particulier, des protéines du cytosquelette (Actine-F), des protéines intervenant dans la réparation de l'ADN (PARP), le clivage de l'ADN (ICAD/CAD pour *caspase activated DNase*), la condensation de la chromatine (Acinus), la condensation nucléaire (Lamine B)²²⁹ et la différenciation (GATA-1)²²⁵ (figure 18 A).

Toutefois, plusieurs observations indiquent que l'activation des caspases est impliquée dans le processus de maturation érythroïde et pourrait jouer un rôle important dans ce phénomène. Une première étude a montré que les caspases-1, -2, -3, -5, -6, -7, -8, et -9 sont exprimées dans les cellules érythroïdes. Les taux de procaspase-2, -3 et -8 sont nettement plus élevés dans les érythroblastes immatures que dans les érythroblastes matures²³⁰. L'activation des caspases au cours de l'érythropoïèse normale et explique les changements morphologiques observés au cours de la maturation terminale. Ainsi, la caspase-3 est activée de façon transitoire au moment où les changements morphologiques des érythroblastes apparaissent. Cette activation se fait par la voie mitochondriale avec dépolarisation de sa membrane et activation de la caspase-9²³¹ mais aussi par la voie Fas comme décrit ci-dessus^{227,228}. L'activation de la caspase-3 est associée à l'activation de la caspase-6 et au clivage de la Lamine B, qui pourrait être responsable de la condensation nucléaire comme cela a été décrit au cours de l'apoptose^{232,233}. De plus la protéine Acinus, responsable de la condensation de la chromatine mais pas de sa dégradation, est activée par clivage par la caspase-3 au cours de la différenciation érythroblastique²³⁴. À l'inverse, bien que les caspases exécutrices soient activées, les cellules n'entrent pas en apoptose comme le montre l'absence de phosphatidyl-sérines à leur membrane et de clivage d'ICAD l'inhibiteur de CAD, nucléase responsable du clivage du DNA²³⁵. De plus, GATA-1 n'est pas dégradée²³¹ (figure 18 B). L'ajout d'un inhibiteur des caspases comme le z-VAD à la culture érythroïde, juste avant la phase d'activation des caspases, entraîne un blocage de la différenciation érythroïde au stade basophile²³¹. Cette observation a été confirmée et approfondie en démontrant le rôle essentiel de la caspase-3 dans la différenciation érythroïde en utilisant une stratégie d'inhibition spécifique de la caspase-3 par ARN interférence (siRNA)²³⁶. Ces données ont aussi été confirmées dans les érythroblastes murins. Dans ce modèle, il a été montré que l'hyper-expression de Raf-1, qui prévient l'activation des caspases, empêche la maturation érythroïde

en inhibant la différenciation induite par les caspases. Un phénomène opposé est observé dans les souris Raf-1^{-/-} ²³⁷. Ainsi, le destin (apoptose versus différenciation) des précurseurs érythroïdes est décidé en aval de l'activation de la caspase-3 et serait donc déterminé par les cibles clivées par les caspases.

Cette nouvelle fonction des caspases est retrouvée dans d'autres systèmes de différenciation hématopoïétiques, notamment, au niveau de la formation plaquettaire à partir de mégacaryocytes ²³⁸, au cours de la différenciation des monocytes du sang circulant en macrophages ²³⁹ ou lors de la différenciation des cellules énucléées comme les kératinocytes et les cellules du cristallin ^{240,241}, mais aussi des cellules musculaires cardiaques et dans le système immunitaire, dans l'activation lymphocytaire T ²⁴².

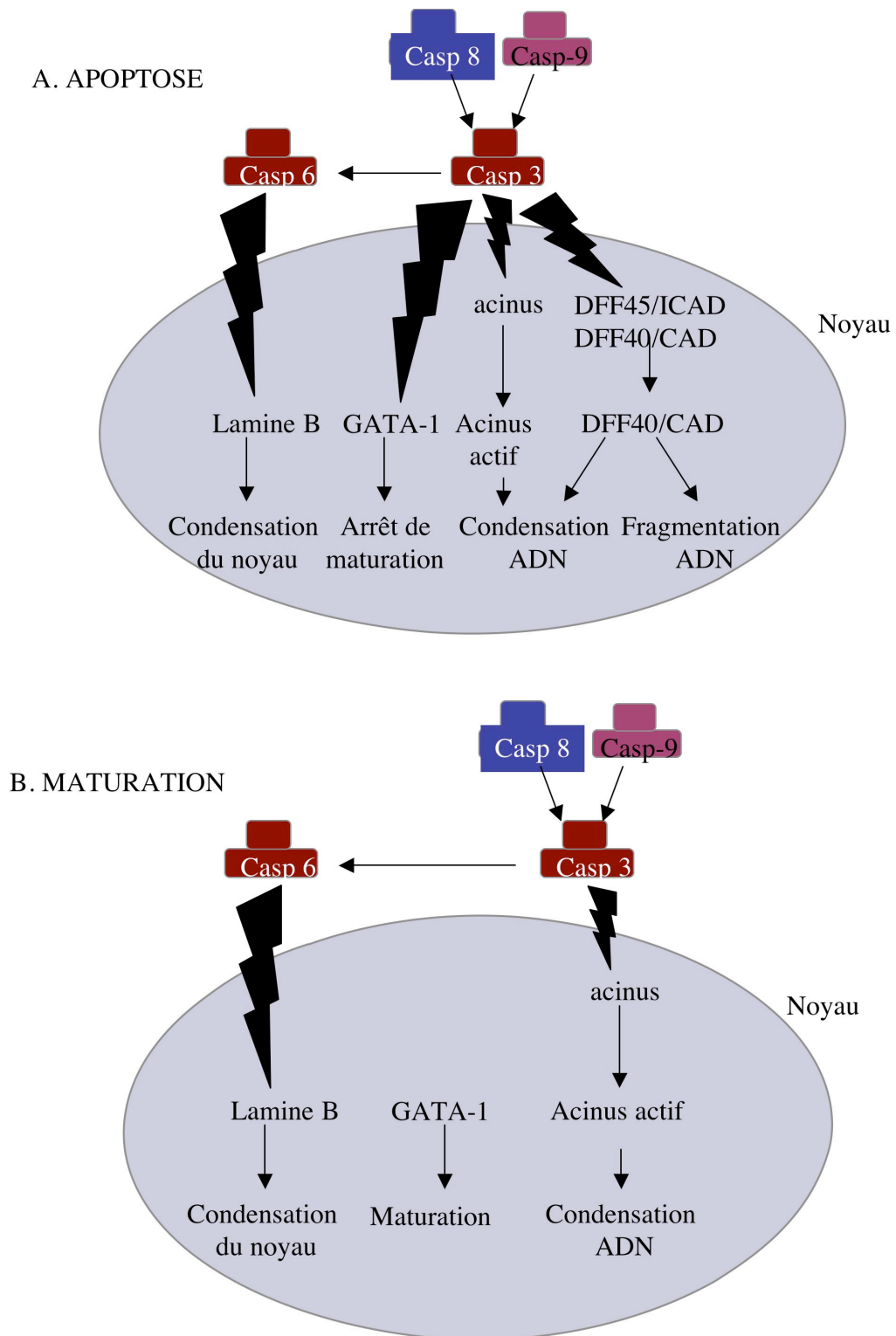


Figure 18 **Rôles des caspases au cours de l'apoptose et la différenciation érythroïde terminale.**

A) Au cours de l'apoptose, les caspases 8, 9, 3 et 6 sont activées et induisent l'activation de protéines (acinus, DFF45/ICAD) ou la dégradation de protéines nécessaires à la survie (lamine B, GATA-1) par clivage. B) Dans le cadre de la différenciation érythroïde terminale, GATA-1 et DFF45/ICAD ne sont pas clivées, permettant ainsi les modifications morphologiques observées lors de la maturation, sans apoptose.

6 Rôles des protéines de choc thermique (Hsp)

6.1 Les Hsp, protéines chaperonnes

Les protéines de stress ou de choc thermique (Hsp ou *heat shock protein*) constituent une classe de protéines très conservées dans l'évolution. Les Hsp des mammifères sont classées en 5 familles selon leur taille moléculaire : Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 et les petites Hsp (de 15 à 30 kDa) incluant Hsp27. Chaque famille est composée de membres exprimés soit constitutivement, soit de manière régulée et dans différents compartiments cellulaires. Le besoin d'Hsp augmente suite à un dommage toxique des protéines ou un stress tels que la chaleur, le stress oxydatif, l'irradiation ou encore des thérapies chimiques anticancéreuses ²⁴³. Les Hsp ont un fort potentiel cytoprotecteur, c'est à dire qu'elles permettent aux cellules de s'adapter à des changements graduels de leur environnement et de survivre dans des conditions de stress. Les chaperonnes sont utiles pour la signalisation et le trafic des protéines, même en absence de stress. Elles se comportent aussi comme des protéines chaperonnes d'autres protéines cellulaires. Les fonctions importantes attribuées aux chaperonnes sont : (1) l'import de protéines dans les compartiments cellulaires, (2) la conformation de protéines dans le cytosol, le réticulum endoplasmique, la mitochondrie, (3) la dégradation des protéines instables, (4) la dissolution des complexes protéiques, (5) la prévention de l'agrégation des protéines, (6) la conformation des protéines mal conformées ²⁴⁴.

Hsp60 et sa co-chaperonne Hsp10 sont surtout étudiées chez la bactérie (équivalent chez la bactérie à GroEL et GroES respectivement) ²⁴⁴. Hsp60 de mammifères est une protéine constitutive retrouvée dans la matrice mitochondriale, bien que 15 à 20% soit cytosolique. Hsp60 participe à la conformation des protéines mitochondriales et facilite la dégradation protéolytique des protéines dénaturées ou dans un mauvais état de conformation de manière dépendante de l'ATP. Une fois libérées de la mitochondrie, elles accélèrent la maturation de la pro-caspase 3 ^{245,246}.

Dans la famille des Hsp90, on retrouve les chaperonnes dépendantes d'ATP Hsp90, Hsp90 β et Grp94 ²⁴⁷. Les deux isoformes d'Hsp90, essentiels pour la viabilité des cellules eucaryotes, sont moins abondantes constitutivement. Cette protéine constitue 1 à 2% des protéines cytosoliques et s'accumule en réponse au stress. Les protéines Hsp90 s'associent à des protéines de la signalisation incluant des facteurs de transcription comme le récepteur aux

stéroïdes ²⁴⁸, mais aussi MyoD ²⁴⁹, des tyrosine kinases comme v-Src ²⁵⁰, des sérine/tréonine kinases comme Raf-1 ²⁵¹. Leur rôle chaperon principal est la maturation conformationnelle de ces facteurs de transcription et kinases de transduction du signal.

La famille des Hsp70 est la classe d'Hsp la plus conservée et la mieux étudiée. Les cellules humaines contiennent différents membres de la famille Hsp70, notamment Hsp70 inductible par le stress, Hsc70 qui est constitutivement exprimée, la mitochondriale Hsp75 et enfin GRP78 localisée dans le réticulum endoplasmique ²⁵². Dans les conditions normales, les Hsp70 sont des molécules chaperonnes ATP-dépendantes impliquées dans la conformation des polypeptides nouvellement synthétisés, l'assemblage des complexes multi-protéiques et le transport protéique transmembranaire ^{253,254,255}. De plus, dans des conditions de stress, la synthèse d'Hsp70 inductible permet aux cellules de supporter les concentrations accrues de protéines dénaturées ou mal conformées ²⁵⁶. Hsp70 est composé de deux domaines fonctionnels distincts: un domaine de liaison peptidique (PBD ou *peptide binding domain*) et le domaine ATPase en N-terminal (ABD ou *ATPase binding domain*) ²⁵⁷. Le PBD incluant la partie C-terminal et le motif chaperonne EEVD, est responsable de la liaison au substrat et de la conformation (figure 19 A). Le ABD facilite le relargage des protéines clients après l'hydrolyse de l'ATP ²⁵⁸. L'activité chaperonne d'Hsp70 est régulée par des co-chaperonnes telles que Hip, CHIP ou Bag-1 qui augment ou diminuent leur affinité pour des substrats.

Hsp27 est une chaperonne ATP-indépendante qui protège les cellules de l'agrégation des protéines ²⁵⁹. Hsp27 peut former des oligomères jusqu'à 1000kDa, le dimère d'Hsp27 semble être le bloc de construction du complexe multimérique, le multimer étant l'état compétent de la chaperonne ²⁶⁰. L'oligomérisation joue un rôle central dans la régulation de l'activité chaperonne d'Hsp27 et est un processus hautement dynamique modulé par la phosphorylation d'Hsp27. Hsp27 humain peut être phosphorylé sur 3 résidus sérines ²⁶¹, la phosphorylation favorise la formation de petits oligomères d'Hsp27 alors que la déphosphorylation entraîne la formation de grands oligomères ²⁶² (figure 19 B). La phosphorylation d'Hsp27 est un processus réversible catalysé par les MAPKAP kinase -2 et -3 en réponse à des agents mitogènes, des cytokines inflammatoires telle que TNF et IL-1 β , des agents anti-cancéreux, d'autres oxydants ^{263,264}.

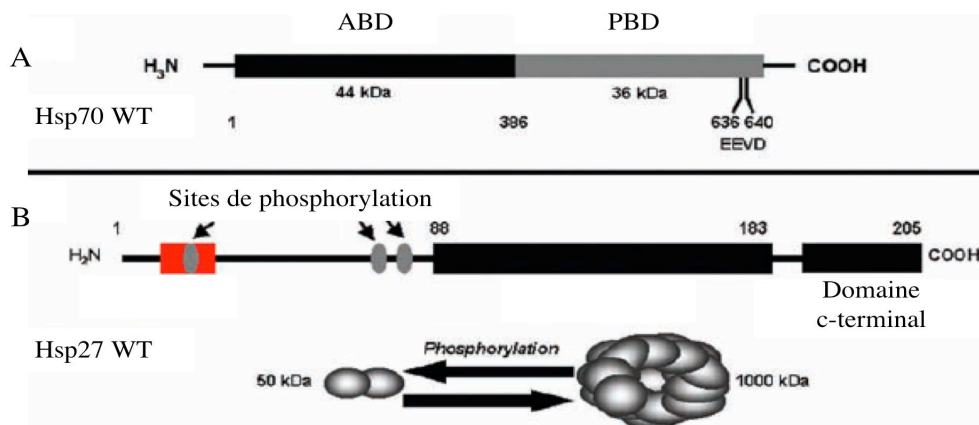


Figure 19 Structure d’Hsp70 et Hsp27.

A) Hsp70 contient deux domaines fonctionnels : le peptide binding domain (PBD) incluant le motif chaperon EEVD en cC-terminal, responsable de la liaison au substrat et du repliement; l’ATP binding domain (ABD) en N-terminal qui facilite le relargage des protéines clients. B) Les trois résidus sérines d’Hsp27 qui peuvent être des sites de phosphorylation et le motif WDPF sont indiqués. Ce motif et la phosphorylation de la protéine peuvent influencer l’état d’oligomérisation de la protéine. Hsp27 peut former des oligomères jusqu’à 1000 kDa. (D’après revue Garrido Cell Cycle 2006).

Outre leur rôle de chaperonne, Hsp27 et 70 sont également des protéines anti-apoptotiques. La surexpression d’Hsp27 et 70 empêche l’apoptose induite par divers stimuli tels que l’hyperthermie, le stress oxydatif, des drogues anti-cancéreuses (cellules du cancer colorectal) ^{265,266,267}. La régulation négative ou l’inhibition d’Hsp27 ou 70 est suffisante pour sensibiliser les cellules à l’apoptose, montrant que le niveau endogène de ces chaperonnes est suffisant pour contrôler l’apoptose ^{268,269}. En effet, ces protéines interagissent avec des protéines clés de la signalisation de l’apoptose. Dans ce travail, les rôles d’Hsp27 et d’Hsp70 seront plus détaillés.

6.2 Hsp27

Rôles anti-apoptotiques d'Hsp27

Des expériences de déplétion d'Hsp27 suggèrent qu'Hsp27 fonctionne principalement comme un inhibiteur de l'activation des caspases. En effet, l'inhibition d'Hsp27 par siRNA induit l'apoptose par l'activation de la caspase-3^{270,271}. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'Hsp27 peut empêcher la formation de l'apoptosome et l'activation des caspases consécutive²⁷². De plus, Hsp27 peut séquestrer le cytochrome c dans la mitochondrie comme cela a été montré dans la lignée U937, des cellules Jurkat de lymphome T, et des cellules de cancer du colon traitées par différents stimuli apoptotiques^{273,274,275}. Dans des cellules de myélome multiple traitées à la dexaméthasone, Hsp27 inhibe aussi le relargage de Smac de la mitochondrie²⁷⁶. De plus, Hsp27 interfère également avec l'activation des caspases en amont de la mitochondrie²⁷⁵. Cet effet semble lié à la capacité d'Hsp27 de stabiliser les microfilaments d'actine. Aussi, lors de la surexpression d'Hsp27, la chaperonne se lie à l'actine F²⁷⁷ empêchant ainsi la rupture du cytosquelette et la redistribution intracellulaire de Bid qui précède le relargage du cytochrome c dans des cellules de fibroscarcome humain traitées à la cytochalasine D ou la staurosporine²⁷⁵. Hsp27 inhibe aussi l'apoptose par la régulation de voies de signalisation. Des facteurs de survie tels que le *nerve growth factor* (NGF) ou le *platelet -derived growth factor* (PDGF) inhibent l'apoptose en activant la voie PI3-K/AKT. Hsp27 se lie à AKT et cette interaction est nécessaire pour l'activation d'AKT dans des cellules stressées. En retour, AKT phosphoryle Hsp27 induisant la rupture du complexe Hsp27-AKT²⁷⁸. Hsp27 intervient également dans la voie de signalisation induite par la stimulation de Fas par FasL. Ainsi, la forme dimérique phosphorylée d'Hsp27 interagit directement avec *daxx* ce qui empêche la connexion entre Fas et la protéine kinase Ask1 qui induit la mort cellulaire indépendante des caspases²⁷⁹. Hsp27 est impliqué dans la croissance tumorale des cellules de cancer de la prostate humaine LNCap via STAT3. Hsp27 interagit avec STAT3 et l'effet protecteur induit par la surexpression d'Hsp27 est aboli par l'inhibition de STAT3²⁷⁰.

Hsp27 a également des propriétés anti-oxydantes importantes liées à sa capacité à maintenir la glutathione dans un état réduit (non oxydé)²⁸⁰ afin de diminuer le nombre de radicaux libres²⁸¹ et de neutraliser l'effet toxique des protéines oxydées²⁸². Cet effet anti-oxydant semble particulièrement relevant dans les cellules neuronales et implique la forme phosphorylée d'Hsp27²⁸³.

Rôle d'Hsp 27 dans la dégradation protéasomale

Le rôle cytoprotecteur d'Hsp27 est aussi lié à sa capacité de promouvoir la dégradation protéasomale. Le système d'ubiquitylation entraîne les protéines marquées vers la dégradation par le protéasome 26S, une protéase à plusieurs sous-unités composée d'une sous-unité catalytique 20S et d'une sous-unité régulatrice 19S. Plusieurs preuves lient le système de dégradation protéasomale avec les Hsp. Lors de l'inhibition de la dégradation protéasomale, des corps à inclusions s'accumulent et des protéines ubiquitinées apparaissent dans la fraction insoluble avec des chaperonnes, dont Hsp27²⁸⁴. Ceci suggère donc un rôle d'Hsp27 dans la dégradation protéasomale *in vivo*²⁸⁵. De plus, Hsp27 colocalise avec des protéines ubiquitinées et la sous-unité 20S du protéasome dans des corps d'inclusion cytoplasmiques qui caractérisent des maladies dégénératives²⁸⁶.

Deux des protéines cibles d'Hsp27 sont l'inhibiteur du facteur de transcription NFB, IκBα et l'inhibiteur de la kinase cycline dépendante p27^{kip1}. Dans différentes lignées cancéreuses (monocytes humains U937, fibroblastes embryonnaires de souris MEF, carcinome du colon de rat REG) traités avec de l'Etoposide ou du TNF, Hsp27 favorise l'ubiquitylation et la dégradation consécutive d'IB ayant pour conséquence une augmentation de l'activité de NFκB qui contribue à l'effet protecteur général d'Hsp27²⁸⁷. Dans des conditions de stress (privation en sérum, traitement à la staurosporine), Hsp27 favorise aussi l'ubiquitylation et la dégradation de p27^{kip1}. Ceci entraîne une accumulation de cellules en phase S car il n'y a plus d'arrêt de cycle en G0/G1. Les cellules qui surexpriment Hsp27 sont donc prêtes à proliférer une fois la condition de stress passée²⁸⁸. Finalement, Hsp27 participe à la déphosphorylation qui contrôle l'activité du régulateur de *splicing* SRp38 permettant ainsi la restauration de l'activité de *splicing* inhibée après un choc thermique²⁸⁹. Il apparaît donc qu'Hsp27 permet d'assurer une dégradation simple et rapide de certaines protéines, permettant aux cellules de survivre dans des conditions de stress. (Figure 20)

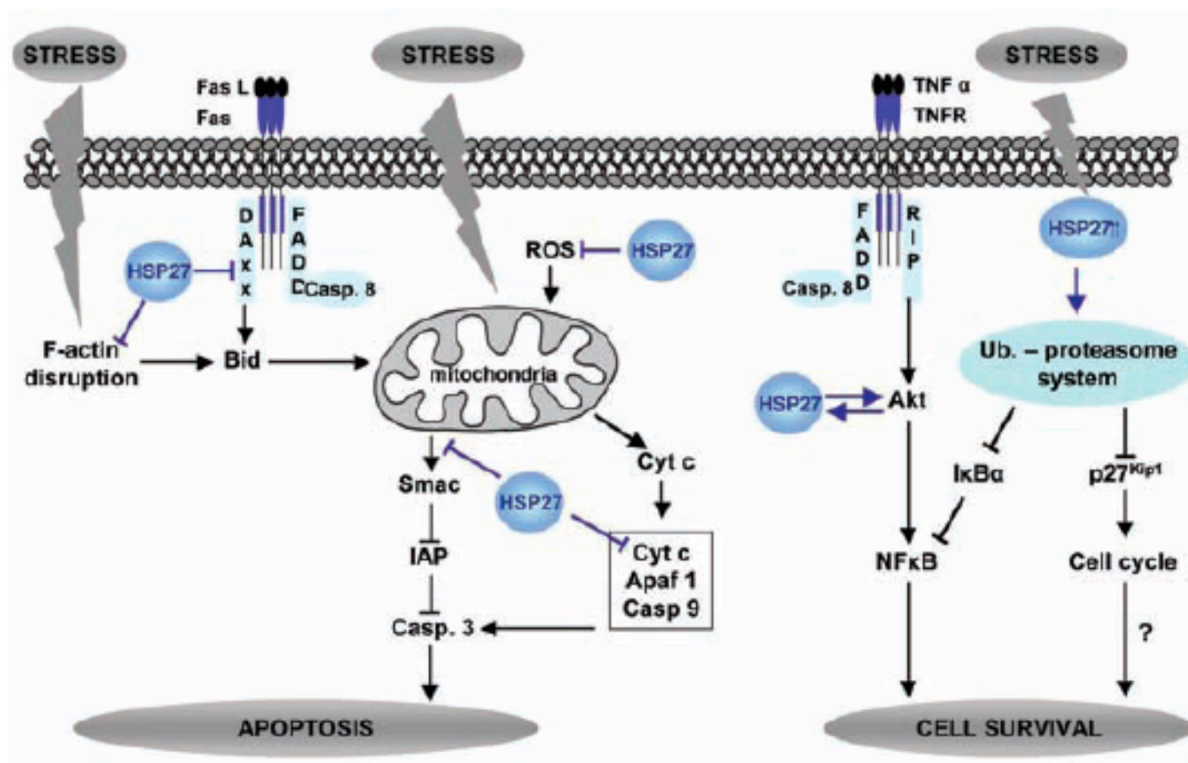


Figure 20 Rôles anti-apoptotiques d'Hsp27

Hsp27 bloque l'activation des caspases à différents stades, notamment au niveau pré-mitochondrial indirectement par son action sur l'actine-F, Bid ou les radicaux libres et au niveau post-mitochondrial en séquestrant le cytochrome c et en inhibant le relargage de Smac. Hsp27 influence aussi l'apoptose en induisant l'ubiquitinylation et la dégradation de protéines telles que I κ B α ou p27^{kip1} dans des conditions de stress. (D'après la revue Garrido Cell Cycle 2006).

6.3 Hsp70

Rôles anti-apoptotiques d'Hsp70

L'expression d'Hsp70 inducible a été observée en présence de divers stress comme la génération de radicaux libres, la modification du potentiel transmembranaire mitochondrial, la libération de cytochrome *c* de la mitochondrie et l'activation de caspases de type caspase-3²⁹⁰. L'induction de la protéine Hsp70 augmente la capacité des cellules stressées à faire face à une concentration accrue de protéines non repliées ou dénaturées²⁵⁶. L'expression d'Hsp70 inducible est augmentée dans les cellules cancéreuses de souris²⁹¹ et peut inhiber l'apoptose, augmentant ainsi la survie de cellules exposées à différents stimuli létaux^{292,293}. En effet, la surexpression d'Hsp70 inducible réduit ou bloque l'activation des caspases et supprime les altérations mitochondriales et les fragmentations nucléaires²⁹⁴. Hsp70 protège les cellules de

l'apoptose en agissant à la fois en amont et en aval de l'activation de la cascade des caspases.

En amont de la mitochondrie, Hsp70 lie et inhibe JNK1 (c-Jun N-terminal Kinase)²⁹⁵. Il semble qu'Hsp70 peut affecter la mort cellulaire dépendante de Bid par l'inactivation de JNK grâce à un mécanisme encore non déterminé²⁹⁶. Dans des fibroblastes embryonnaires de souris, lors de l'apoptose induite par hyperosmolarité, l'absence d'Hsp70 induit la phosphorylation de JNK et ERK, suggérant un rôle d'Hsp70 dans la déphosphorylation de ces kinases²⁹⁷. Hsp70 lie aussi PKC (*protein kinase C*) mature non phosphorylée permettant sa rephosphorylation et sa stabilisation. De la même manière, Hsp70 lie AKT résultant en sa stabilisation²⁹⁸.

Au niveau mitochondrial, Hsp70 bloque l'apoptose induite par la chaleur en empêchant la translocation et l'insertion de bax dans la membrane externe de la mitochondrie, évitant ainsi la perméabilisation de la membrane et le relargage du cytochrome *c* et AIF²⁹⁹. Ce rôle d'Hsp70 sur la translocation mitochondriale de Bax reste à déterminer dans les progéniteurs érythroïdes.

En aval de la mitochondrie, Hsp70 inhibe l'apoptose en aval du cytochrome *c* et en amont de l'activation de la caspase-3 en s'associant à Apaf-1, ce qui prévient le recrutement de la pro-caspase-9 et la formation de l'apoptosome dans des lignées³⁰⁰.

Par ailleurs, Hsp70 inhibe également de la mort indépendante des caspases puisque Hsp70 protège de la mort dans des conditions où les caspases ne sont pas activées^{301,302}. Ainsi, la surexpression d'Hsp70 protège les cellules MEF Apaf-1^{-/-} de l'apoptose induite par la privation en sérum³⁰², montrant qu'Apaf-1 n'est pas la seule cible de l'action anti-apoptotique d'Hsp70. En effet, Hsp70 s'associe directement à AIF (Apoptosis Inducing Factor), inhibe sa translocation nucléaire et la condensation de la chromatine induite par celle-ci^{302,303,304}. Le niveau endogène d'Hsp70 semble être suffisamment élevé pour contrôler l'apoptose induite par AIF puisque l'inhibition d'expression d'Hsp70 par un anti-sens sensibilise les cellules à la privation en sérum et AIF³⁰². De plus, au cours de la différenciation érythroïde reproduite dans la lignée humaine TF1 sous Epo, l'expression d'Hsp70 est augmentée afin de maintenir AIF dans le cytosol et empêcher les dommages à l'ADN³⁰⁵.

Hsp70 peut aussi agir à des phases plus tardives de l'apoptose. Lors de l'apoptose induite par le TNF, Hsp70 n'empêche pas l'activation de la caspase-3, mais empêche les changements morphologiques caractéristiques de la mort telle que la morphologie nucléaire. Il a été mis en évidence grâce à des expériences de surexpression d'Hsp70 dans la lignée ME-180 de carcinome cervical humain que l'action anti-apoptotique d'Hsp70 contre l'effet de la

staurosporine peut s'exercer en aval de l'activation des caspases en bloquant la fragmentation de l'ADN. En effet, ces cellules sont capables de reprendre une croissance normale malgré la libération de cytochrome c et le clivage de substrats des caspases comme PARP, PKC delta et cPLA₂²⁹⁰. L'activité enzymatique de CAD et son repliement correct sont régulés par Hsp70, sa-cochaperonne Hsp40 et ICAD. ICAD reconnaît une forme de CAD ayant un repliement intermédiaire conféré par Hsp70-Hsp40³⁰⁶. Ces résultats indiquent que, dans certaines conditions, le point de non-retour dans la voie de l'apoptose se situe en aval de l'activation des caspases.

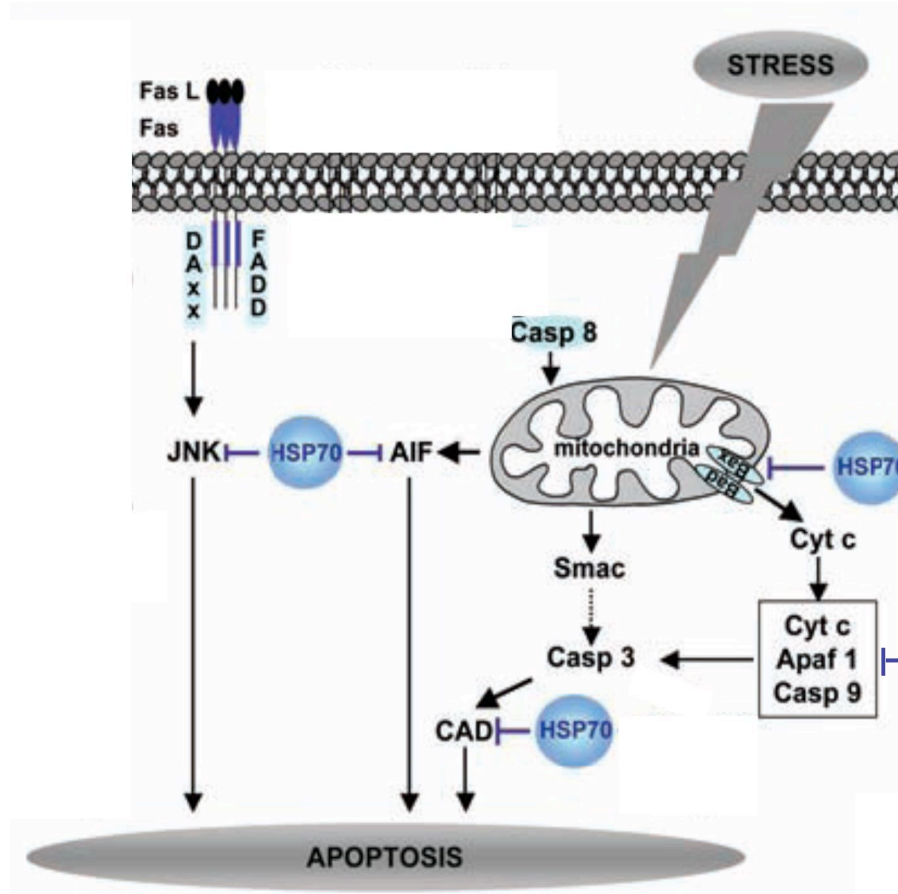


Figure 21 Rôles anti-apoptotiques d'Hsp70.

Hsp70 bloque l'apoptose au niveau pré-mitochondrial en inhibant la signalisation induite par le stress. Au niveau mitochondrial, Hsp70 empêche la perméabilisation de la membrane mitochondriale en bloquant la translocation de Bax. Au niveau post-mitochondrial en interagissant avec AIF et Apaf-1 ou en protégeant CAD. (D'après la revue Garrido Cell Cycle 2006).

Rôle d'Hsp70 dans la dégradation protéasomale

Le rôle d'Hsp70 dans la dégradation protéasomale semble moins direct que pour Hsp27 puisqu'il est médié par les co-chaperonnes CHIP (*C-terminus of HSC70-interacting protein*) et Bag-1. CHIP est une ubiquitine ligase qui, en interagissant avec Hsp70, capture efficacement les protéines dénaturées, les ubiquitine puis s'associe à la sous-unité 19S du protéasome pour assurer leur dégradation^{307,308,309}. Hsp70 agit donc comme un adaptateur pour CHIP afin d'induire l'ubiquitylation des protéines clients³¹⁰. Une autre co-chaperonne d'Hsp70, Bag-1, se lie aussi à la machinerie de dégradation des protéines^{311,312}. CHIP et Bag-1 coopèrent pour moduler l'activité de la chaperonne dans le repliement des protéines vers la dégradation^{313,314}.

Rôle d'Hsp70 dans l'import nucléaire

Le transport de macromolécules entre le noyau et le cytoplasme est un procédé cellulaire critique affectant directement l'expression génique et la transduction du signal. Le transport bidirectionnel de macromolécules (protéines et ARNm) entre le cytoplasme et le noyau à travers l'enveloppe nucléaire (NE ou *nuclear envelope*) est médié par le complexe du pore nucléaire (NPC ou *nuclear pore complex*). Le NPC permet le passage par diffusion passive de molécules de masse moléculaire de 40 kDa. Le transport de macromolécules telles que des protéines ou ARNm se fait lui par un mécanisme signal et énergie-dépendant³¹⁵. L'import nucléaire de protéines karyophiles contenant une courte séquence d'acides aminés appelée séquence de localisation nucléaire (NLS ou *nuclear localization sequence*) est un procédé à plusieurs étapes débutant par la reconnaissance indépendante d'énergie de la protéine substrat par des facteurs cytoplasmiques. Cette étape est suivie par l'attachement du complexe « substrat-récepteur » à la face cytoplasmique du NPC puis, par la translocation dépendante d'énergie à travers l'élément de transport central. L'import nucléaire de protéines est contrôlé par des mécanismes spécifiques de substrats dont l'attachement, le masquage du NLS ou des modifications covalentes du NLS. Le transport de kinases nucléaires et de facteurs de transcription est, par exemple, contrôlé par phosphorylation³¹⁶.

Cinq facteurs cytosoliques ont été identifiés comme nécessaires pour l'import nucléaire : le récepteur NLS/importine, p97, Ran GTPase/TC4, NTF2/B-2 mais également Hsp70. En effet, un rôle d'Hsp70 dans le transport nucléaire est décrit dans différentes études. Ainsi, l'import de protéines contenant soit la NLS de l'antigène grand T de SV40 ou de la NLS de la nucléoplasmine est inhibé par microinjection d'anticorps anti-Hsp70³¹⁷. Des études *in vitro* ont montré la déplétion d'Hsp70 d'extraits cytosoliques empêche l'import karyophile

^{255,318}. Enfin, l'expression ectopique d'Hsp70 humain dans des cellules de souris complémente le défaut d'import d'un mutant de la NLS de l'antigène grand T de SV40 ³¹⁹. Ces résultats indiquent qu'Hsp70 peut faciliter la liaison du NLS au récepteur NLS lors de la phase précoce du ciblage. Par ailleurs, un niveau élevé d'Hsp70 est suffisant pour supprimer le défaut d'import nucléaire de la protéine de fusion GFP- NLS de l'antigène grand T de SV40 dans des cellules mutées pour le NLS récepteur Srp1p ou NUP82 codant une protéine dont la fonction dans le NPC est ultérieure à l'attachement ³²⁰. Ces résultats montrent donc qu'outre le rôle d'Hsp70 dans l'attachement, elle joue également un rôle lors de la phase de translocation de l'import nucléaire. Ceci, probablement par son activité chaperonne en favorisant la formation et la stabilité du complexe Srp1p-NLS-substrat. De cette manière, Hsp70 traverse la NE et entre dans le noyau comme facteur de transport en association avec le substrat NLS et Srp1p. Il a été montré qu'une mutation de NUP155, une nucléoporine qui est un composant moléculaire critique pour l'assemblage et la fonction du NPC, est responsable de la fibrillation atriale. En effet, la perte de fonction de NUP155 provoque une diminution de la perméabilité de la NE et une inhibition de l'import nucléaire d'Hsp70 (protéine) et de l'export nucléaire d'ARNm d'Hsp70 ³²¹.

Résultats

1 Rôle de la protéine de choc thermique Hsp70 au cours de la différenciation érythroïde terminale:

1.1 Contexte scientifique et situation du projet

Au cours de l'érythropoïèse, GATA-1 est un facteur majeur de la différenciation érythroïde terminale en permettant l'expression du REpo, de la GPA, de la globine et en coopération avec STAT5, GATA-1 permet l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L.

Les caspases sont connues pour jouer un rôle dans l'apoptose, mais dans le laboratoire, il a été montré que l'inhibition des caspases entraîne l'arrêt de maturation des progéniteurs érythroïdes au stade basophile, avant la condensation du noyau et de la chromatine. Au cours de la différenciation érythroïde, la caspase-3 est transitoirement activée ce qui permet le clivage de protéines impliquées dans l'intégrité du noyau comme la Lamine B ou la condensation de la chromatine comme Acinus, sans induire de mort cellulaire puisque GATA-1 n'est pas clivé. Ces résultats montrent un nouveau rôle des caspases comme enzymes clés dans le processus de différenciation érythroïde ²³¹. Ainsi, le destin (apoptose versus différenciation) des précurseurs érythroïdes est décidé en aval de l'activation de la caspase-3. Le passage apoptose versus différenciation serait donc déterminé par le choix des cibles clivées par les caspases. Dans ce modèle de différenciation induite par les caspases, il reste à comprendre par quels mécanismes les cibles sont protégées du clivage puisque la protéine GATA-1 colocalise avec la caspase-3 activée dans le noyau.

Dans mon travail de thèse, nous avons essayé de comprendre par quel mécanisme GATA-1 n'est pas clivé alors que les caspases sont activées. Nous avons donc étudié le mécanisme de protection de GATA-1 de la caspase-3 au cours de la différenciation érythroïde terminale.

1.2 Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3 mediated-cleavage of GATA-1

Jean-Antoine Ribeil*, Yael Zermati*, **Julie Vandekerckhove**, Severine Cathelin, Joelle Kersual, Michaël Dussiot, Séverine Coulon, Ivan Cruz Moura, Ann Zeuner, Thomas Kirkegaard-Sørensen, Bruno Varet, Eric Solary, Carmen Garrido & Olivier Hermine

Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1

Jean-Antoine Ribeil^{1*}, Yael Zermati^{1,2*}, Julie Vandekerckhove¹, Severine Cathelin², Joelle Kersual¹, Michaël Dussiot¹, Séverine Coulon¹, Ivan Cruz Moura¹, Ann Zeuner³, Thomas Kirkegaard-Sørensen⁴, Bruno Varet^{1,5}, Eric Solary², Carmen Garrido² & Olivier Hermine^{1,5}

Caspase-3 is activated during both terminal differentiation and erythropoietin-starvation-induced apoptosis of human erythroid precursors. The transcription factor GATA-1, which performs an essential function in erythroid differentiation^{1,2} by positively regulating promoters of erythroid and anti-apoptotic genes³⁻⁶, is cleaved by caspases in erythroid precursors undergoing cell death upon erythropoietin starvation or engagement of the death receptor Fas^{7,8}. In contrast, by an unknown mechanism, GATA-1 remains uncleaved when these cells undergo terminal differentiation upon stimulation with Epo⁹⁻¹¹. Here we show that during differentiation, but not during apoptosis, the chaperone protein Hsp70 protects GATA-1 from caspase-mediated proteolysis. At the onset of caspase activation, Hsp70 co-localizes and interacts with GATA-1 in the nucleus of erythroid precursors undergoing terminal differentiation. In contrast, erythropoietin starvation induces the nuclear export of Hsp70 and the cleavage of GATA-1. In an *in vitro* assay,

Hsp70 protects GATA-1 from caspase-3-mediated proteolysis through its peptide-binding domain. The use of RNA-mediated interference to decrease the Hsp70 content of erythroid precursors cultured in the presence of erythropoietin leads to GATA-1 cleavage, a decrease in haemoglobin content, downregulation of the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-X_L, and cell death by apoptosis. These effects are abrogated by the transduction of a caspase-resistant GATA-1 mutant. Thus, in erythroid precursors undergoing terminal differentiation, Hsp70 prevents active caspase-3 from cleaving GATA-1 and inducing apoptosis.

During erythropoiesis, caspase activation is required for maturation of erythroblasts. In this process, however, in contrast to what occurs during the apoptosis of erythroblasts, some targets, including GATA-1, remain uncleaved (Supplementary Fig. S1). The fate of erythroblasts is therefore determined downstream of caspase activation by an unknown mechanism.

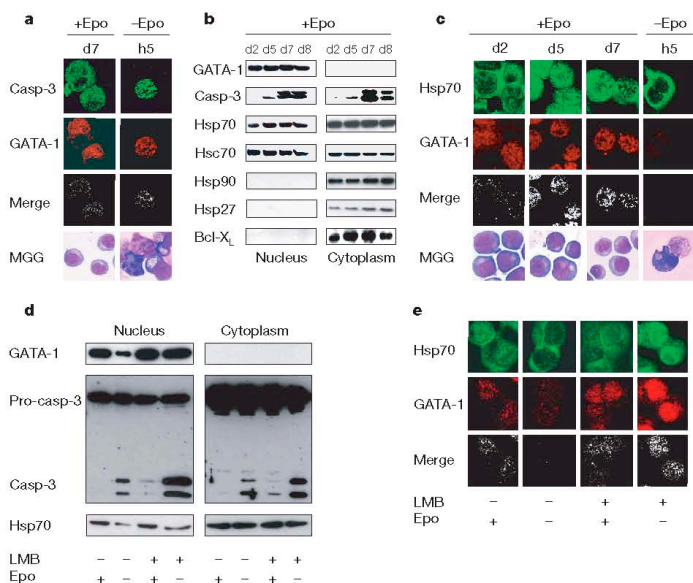


Figure 1 | Hsp70 nuclear expression and co-localization with GATA-1 in differentiating erythroblasts is lost during erythropoietin-starvation-induced apoptosis. **a**, Top three rows: co-localization (white) of GATA-1 (red) and active caspase-3 (p17 subunit, green) at day 7 with erythropoietin (+Epo, d7) or after cytokine starvation for 5 h (-Epo, h5). Bottom row: morphological (MGG) analysis of cytokine-deprived cells (magnification $\times 40$). **b**, Protein expression for the indicated days (d2 to d8) in the presence of erythropoietin. **c**, Top three rows: Hsp70 (green) and GATA-1 (red) co-localize in the nucleus in the presence of erythropoietin. Bottom row: MGG analysis ($n = 5$). **d**, **e**, Immunoblot analysis (**d**) and confocal microscopy analysis (**e**) at day 4, pretreated (+) or not (-) with 20 nM leptomycin B (LMB) for 1 h before being starved of erythropoietin (-Epo) or not (+Epo) for 5 h. One representative experiment of three is shown. Casp, caspase.

¹CNRS UMR 8147, Faculté de Médecine et Université René Descartes Paris V, Institut Fédérative Necker, 75270 Paris, France. ²INSERM UMR 517, 21079 Dijon, France. ³Department of Hematology and Oncology, Istituto Superiore di Sanità, 00161 Roma, Italy. ⁴Department of Apoptosis, Institute for Cancer Biology, Danish Cancer Society, Strandboulevarden 49, 2100 Copenhagen. ⁵Department of Hematology, Faculté de Médecine et Université René Descartes Paris V, Assistance publique des hôpitaux de Paris, Necker, 75270 Paris, France. *These authors contributed equally to this work.

During erythroid differentiation, caspase-3, and to a smaller extent caspase-7 but not other caspases (Supplementary Fig. S2), is found activated in the nucleus and co-localized with GATA-1 (Fig. 1a, b). Bcl-X_L, a key survival factor in erythropoiesis, prevents the release of pro-apoptotic molecules from the mitochondria to the cytosol, upstream of caspase activation^{12,13}; it therefore may not account for the differential effect of activated caspases in erythropoietin-stimulated and erythropoietin-deprived erythroblasts. Other protective proteins include stress-inducible proteins such as the heat-shock proteins Hsp90, Hsp70 and Hsp27. These molecular chaperones modulate the assembly, transport and folding of other proteins¹⁴. They also have key functions in cell survival after stressful stimuli, for example by associating with apoptogenic proteins downstream of the mitochondria, including cytochrome *c* (ref. 15), Apaf-1 (ref. 16) and apoptosis-inducing factor (AIF)¹⁷. The inducible Hsp70 was shown also to rescue cells from apoptosis at a later stage than any other known survival factor, downstream of caspase activation¹⁸. Although its role is unknown, Hsp70 is expressed constitutively in erythroid cells of *Xenopus laevis*¹⁹. On the basis of these observations, we examined whether Hsp70 was expressed during human erythroid differentiation and whether it could protect GATA-1 from cleavage by activated caspases. We studied Hsp70 expression, localization and interaction with GATA-1 during both erythroblast differentiation and erythropoietin-starvation-induced apoptosis.

Hsp27, Hsp70 and Hsp90 proteins were expressed constitutively in human erythroblasts undergoing differentiation (Fig. 1b). Of these three proteins, only Hsp70 was highly expressed in the nucleus of differentiating cells (Fig. 1b), where it co-localized with GATA-1 (Fig. 1c). Similar results were found in fresh bone marrow glycoporphin-A-positive cells (Supplementary Fig. S3), excluding the possibility that the nuclear expression of Hsp70 was the consequence of cell culture. The intensity of GATA-1 and Hsp70 co-localization increased with the level of caspase activation (Fig. 1b, c). In contrast, during erythropoietin-starvation-induced apoptosis, Hsp70 lost nuclear localization, which correlated with a decreased expression of GATA-1 (Fig. 1c–e), indicating caspase-3-mediated cleavage⁹. Addition of the Crm1-mediated nuclear export inhibitor leptomycin B to erythropoietin-starved cells prevented the nuclear export of Hsp70 and degradation of GATA-1, despite a higher level of activated caspase-3 than observed during apoptosis (Fig. 1d, e). Moreover, in the presence of leptomycin B, Hsp70 co-localized with GATA-1 in the nucleus of erythropoietin-starved erythroblasts (Fig. 1d, e).

Immunoprecipitation experiments on whole-cell extracts (Fig. 2a) as well as nuclear extracts (not shown) from differentiated erythroblasts demonstrated that Hsp70 co-immunoprecipitated with GATA-1, whereas neither Hsp90 nor Hsp27 interacted with the transcription factor. This interaction seemed to be specific because Hsp70 did not interact with lamin B, another nuclear protein that is cleaved by caspases in differentiating erythroid cells⁹, or with acinus (data not shown). By using Hsp70 deletion mutants, we observed that binding of Hsp70 to GATA-1 involved the peptide-binding domain of Hsp70 (Fig. 2b, c). After withdrawal of erythropoietin, co-immunoprecipitation between Hsp70 and GATA-1 was decreased as a consequence of GATA-1 cleavage, but the remaining Hsp70 in the nucleus still interfered with and protected GATA-1, as demonstrated by increasing GATA-1 input (Supplementary Fig. S4). Taken together, these data indicate that the peptide-binding domain of Hsp70 was required to maintain GATA-1 integrity when caspases were activated during erythroid differentiation.

Accordingly, an *in vitro* proteolysis assay showed that recombinant Hsp70 protected GATA-1 from cleavage by caspase-3 in a dose-dependent manner, whereas recombinant Hsp90 did not (Fig. 2d). The Hsp70-mediated protection seemed to be protein-specific because, in this *in vitro* assay, Hsp70 did not prevent the caspase-3-induced cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase, a protein cleaved in erythroid cells that are undergoing differentiation (Fig. 2d). In accordance with co-immunoprecipitation experiments, the GATA-1

protection was lost when the peptide-binding domain of Hsp70 was deleted (Fig. 2e).

To further show the role of Hsp70 in determining the fate of erythroblasts, Hsp70 expression was inhibited with an approach involving RNA-mediated interference. Transient transfection of Hsp70-specific short interfering RNAs (siRNA Hsp70) in erythroid precursors significantly decreased the Hsp70 protein level 7.5-fold and 4-fold at days 2 and 4, respectively (Fig. 3a, b); this decrease was observed both in the nucleus and in the cytoplasm (Supplementary Fig. S5). At day 6, Hsp70 level in Hsp70-specific siRNA-transfected cells had returned to the level observed in scramble siRNA-transfected erythroid cells (data not shown). To achieve a greater inhibition of Hsp70 at the time of onset of caspase-3 activation, terminal erythroid differentiation was accelerated by omitting stem cell factor (SCF) from the culture medium²⁰, because this omission did not increase cell apoptosis (data not shown). In these culture conditions, caspase-3 remained inactivated at day 2 and no significant difference was observed between Hsp70-specific and control siRNA-transfected cells with regard to GATA-1 expression, apoptosis and cell differentiation. At the onset of caspase-3 activation (day 4), GATA-1 remained intact in control siRNA-transfected cells, whereas the protein was almost completely degraded in Hsp70-depleted cells (Fig. 3a, b). As

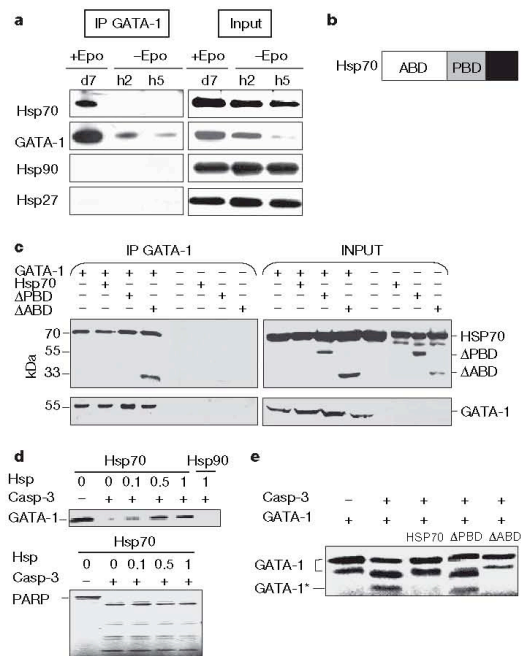


Figure 2 | Co-immunoprecipitation of GATA-1 and Hsp70 during erythroid differentiation. **a**, Immunoprecipitation (IP) of GATA-1 in whole cell extracts at day 7 with erythropoietin (+Epo, d7) or after cytokine starvation for 2 and 5 h (-Epo, h2 and h5), and immunoblotting for indicated proteins. **b**, Representation of Hsp70: ATP-binding domain (ABD) and peptide-binding domain (PBD). **c**, Immunoprecipitation of GATA-1 in GATA-1-transduced HeLa cells transfected with plasmids encoding Hsp70 or mutant (Δ ABD, Δ PBD) proteins. **d**, **e**, SDS-PAGE analysis of *in vitro*-translated ³⁵S-labelled GATA-1 and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) exposed to recombinant caspase-3 and increasing amounts (0–1 μ g) of recombinant Hsp70 or Hsp90 (1 μ g) (**d**) or full-length or deleted mutants of Hsp70 (**e**). GATA-1* indicates a GATA-1 cleaved fragment. In all panels, one representative experiment of three is shown. Casp, caspase.

expected, the degradation of GATA-1 in Hsp70-depleted erythroblasts at day 4 was associated with a strong decrease in the expression of GATA-1-regulated gene products; for example, fewer than 10% of cells were haemoglobinized, in comparison with almost 50% in control cells ($P < 0.005$; data not shown) and Bcl-X_L protein level was decreased (Fig. 3b). Depletion of Hsp70 also markedly decreased the total cell number (Fig. 3d) while increasing the rate of cell death at day 4 (40% in Hsp70-depleted versus 7% in control siRNA-transfected cells; $P = 0.007$; Fig. 3e). Morphological analysis of cells indicated that Hsp70 depletion induced a decrease in cell differentiation (Fig. 3c, f); that is, the proportion of immature erythroblasts (identified by their basophilic cytoplasm and larger size) with nuclear chromatin condensation was only 10% in Hsp70-depleted cells at day 4, which was similar to that in control cells, whereas the proportion of mature erythroblasts (identified by their acidophilic cytoplasm and smaller size) exhibiting nuclear features of apoptosis was about 90% in Hsp70-depleted cells ($P = 0.0004$) (Fig. 3c, g).

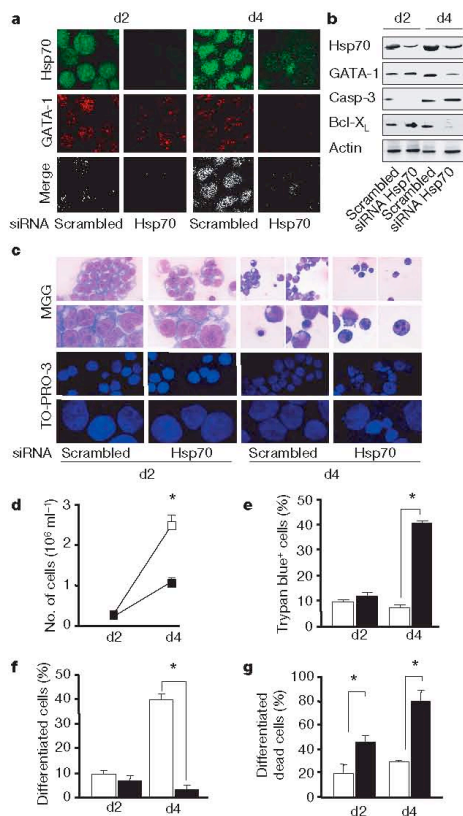


Figure 3 | Decreased Hsp70 content induces death of erythroblasts undergoing differentiation. Analysis of erythroid progenitors 2 days (d2) and 4 days (d4) after transfection with siRNA targeting Hsp70 or a scrambled siRNA. **a**, Confocal microscopy analysis of GATA-1 and Hsp70 expression. **b**, Immunoblot analysis of indicated proteins in whole-cell lysates. **c**, Cell and nucleus morphology assessed by MGG and TO-PRO-3 analysis at various magnifications. **d**, Growth curves. **e**, Percentage of cell death. **f**, Percentage of mature cells. **g**, Percentage of mature cells exhibiting morphological features of apoptosis. Graphed results are means and s.e.m. for three independent experiments; open bars and symbols, scrambled siRNA; filled bars and symbols, Hsp70 siRNA. Asterisk, $P < 0.05$.

Similar results were obtained when Hsp70 expression was decreased by the use of antisense oligonucleotides (Supplementary Fig. S6). We also observed the same results in the presence of SCF, by using a stealth Hsp70 siRNA that exhibits a longer half-life than standard siRNAs, ruling out an increase in apoptosis due to the lack of SCF in the culture medium (Supplementary Fig. S7). Taken together, these findings indicated that Hsp70 depletion prevented erythroid cells from undergoing terminal differentiation by allowing activated caspase-3 to trigger apoptotic cell death.

To check whether the effect of Hsp70-targeting siRNA was due to GATA-1 cleavage rather than to a general effect on cellular metabolism, a previously described GATA-1 mutant (μG1)⁸ that resists caspase-mediated cleavage was retrovirally transduced in CD34-positive cells. The same vector encoding wild-type GATA-1 (WT G1) and the empty vector were used as controls. Cell proliferation was decreased by 50% both in cells transfected with wild-type G1 and cells in transfected with μG1 , in accordance with previous observations²¹. As expected, transfection with siRNA targeting Hsp70 in cells transfected with either the empty or the wild-type GATA-1-encoding vectors resulted in a decrease in GATA-1 expression (Fig. 4a), cell expansion (Fig. 4b) and cell maturation (Fig. 4d), while increasing

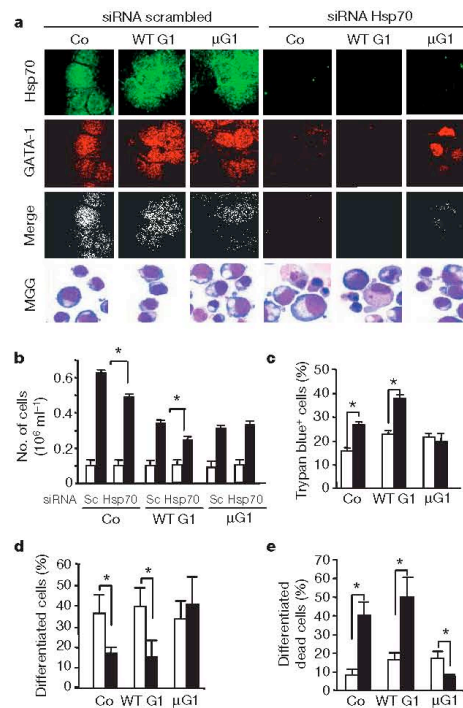


Figure 4 | Transduction of caspase-resistant GATA-1 mutant protects erythroblasts from death after depletion of Hsp70. CD34⁺ haematopoietic cells transfected with an empty vector (Co), a vector encoding wild-type GATA-1 (WT G1), or Asp 125-mutated GATA-1 (μG1) were transfected with Hsp70 siRNA or scrambled siRNA (Sc). **a**, Confocal microscopy analysis of GATA-1 and Hsp70 expression. Cell maturation was assessed by morphological (MGG) analysis. **b**, Cell expansion assessed at day 2 (open bars) or day 4 (filled bars). **c**, Percentage of trypan-blue-positive cells. **d**, Percentage of differentiated cells. **e**, Percentage of differentiated cells exhibiting morphological features of apoptosis all at day 4. In **c–e**, open bars, scrambled siRNA; filled bars, Hsp70 siRNA. Graphed results are means and s.e.m. for three independent experiments. Asterisk, $P < 0.05$.

mature cell death (Fig. 4c, e). In contrast, Hsp70 siRNA had no significant effect on μ GATA-1 transduced cells (Fig. 4). Taken together, these results suggested that Hsp70 protected differentiating erythroblasts from apoptosis through the inhibition of GATA-1 cleavage by caspase-3.

On the basis of these observations, we propose a model in which erythropoietin protects erythroid cells undergoing differentiation from caspase-mediated apoptosis by regulating the cellular localization of Hsp70 (Supplementary Fig. S8). This model provides a potential explanation for the lack of cell death when caspases are activated in erythroid cells undergoing terminal differentiation^{9–11}. Bcl-X_L is a key protein in erythroid progenitor survival⁴; it acts by preventing the release of pro-apoptotic molecules from the mitochondria²². Our results strongly indicate that Hsp70 is another key erythroid antiapoptotic protein that acts both upstream and downstream of Bcl-X_L. First, by protecting GATA-1 from caspase-3-mediated cleavage, Hsp70 maintains Bcl-X_L expression, in synergy with erythropoietin. Second, Hsp70 saves erythroid progenitors in which caspases are activated from apoptosis-inducing GATA-1 proteolysis. We cannot exclude the possibility that, in addition to these two effects, Hsp70 limits caspase-3 activation by interacting with Apaf-1, thus preventing the formation of the apoptosome^{16,23}.

Thus, our data indicate that the fate of erythroblasts—apoptosis versus differentiation—is determined downstream of caspase activation by the nuclear localization of Hsp70.

METHODS

Erythroid cells were generated as described previously²⁴. Details of reagents and protocols for cell proliferation and differentiation analysis, immunoblot analysis, immunoprecipitation, transfection of siRNAs or antisense cDNA targeting Hsp70 in erythroid progenitors, the production of retroviral particles and the infection of haematopoietic progenitors, the generation of Hsp70 mutants, *in vitro* GATA-1 cleavage assays and confocal fluorescence microscopy analysis are provided in Supplementary Methods. Statistical analyses were performed with the Statview software package. Comparisons were made by analysis of variance. Data are expressed as means and s.e.m. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Received 16 June; accepted 25 October 2006.

Published online 10 December 2006.

1. Fujiwara, Y. *et al.* Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 12355–12358 (1996).
2. 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).
3. Weiss, M. J., Keller, G. & Orkin, S. H. Novel insights into erythroid development revealed through *in vitro* differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev.* **8**, 1184–1197 (1994).
4. Motoyama, N. *et al.* *bcl-x* prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *J. Exp. Med.* **189**, 1691–1698 (1999).
5. Weiss, M. J. & Orkin, S. H. Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 9623–9627 (1995).
6. Gregory, T. *et al.* GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating *bcl-x_L* expression. *Blood* **94**, 87–96 (1999).
7. Gregoli, P. A. & Bondurant, M. C. Function of caspases in regulating apoptosis caused by erythropoietin deprivation in erythroid progenitors. *J. Cell. Physiol.* **178**, 133–143 (1999).
8. De Maria, R. *et al.* Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* **401**, 489–493 (1999).
9. Zermati, Y. *et al.* Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J. Exp. Med.* **193**, 247–254 (2001).
10. Carlile, G. W., Smith, D. H. & Wiedmann, M. Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood* **103**, 4310–4316 (2004).
11. Kolbus, A. *et al.* Raf-1 antagonizes erythroid differentiation by restraining caspase activation. *J. Exp. Med.* **196**, 1347–1353 (2002).
12. Shimizu, S., Narita, M. & Tsujimoto, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483–487 (1999).
13. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322–1326 (1998).
14. Garrido, C. *et al.* HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle* **2**, 579–584 (2003).
15. Bruey, J. M. *et al.* Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nature Cell Biol.* **2**, 645–652 (2000).
16. Beere, H. M. *et al.* Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biol.* **2**, 469–475 (2000).
17. Ravagnan, L. *et al.* Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nature Cell Biol.* **3**, 839–843 (2001).
18. Jaattela, M. *et al.* Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J.* **17**, 6124–6134 (1998).
19. Winning, R. S. & Browder, L. W. Changes in heat shock protein synthesis and hsp70 gene transcription during erythropoiesis of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **128**, 111–120 (1988).
20. Muta, K. *et al.* Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation. *Blood* **86**, 572–580 (1995).
21. Munugalavada, V. *et al.* Repression of c-kit and its downstream substrates by GATA-1 inhibits cell proliferation during erythroid maturation. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 6747–6759 (2005).
22. Gregoli, P. A. & Bondurant, M. C. The roles of Bcl-X_L and apopain in the control of erythropoiesis by erythropoietin. *Blood* **90**, 630–640 (1997).
23. Saleh, A. *et al.* Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nature Cell Biol.* **2**, 476–483 (2000).
24. Zermati, Y. *et al.* Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors. *Exp. Hematol.* **28**, 885–894 (2000).

Supplementary information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Acknowledgements We thank C. Pouzet for her assistance in confocal analysis, F. Valensi and V. Asnafi for their assistance in cytological analysis, Y. Dumez, A. Benachi and F. Audat for providing us with cord blood samples, U. Testa for the cDNAs of GATA-1 and poly(ADP-ribose) polymerase subcloned in PET21, and A. Benmerah for providing us with leptomycin B. This work was supported by grants from the Ligue nationale contre le cancer (LNC), the Fondation pour la recherche médicale (FRM), the Association pour la recherche sur le cancer (ARC), Cancéropole d'Île de France, Fondation de France, Ministère de la recherche and AMGEN.

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. The authors declare no competing financial interests. Correspondence and requests for materials should be addressed to O.H. (hermine@necker.fr) or Y.Z. (zermati@igr.fr).

Supplementary note**Hsp70 and Hsc70**

In humans, the inducible Hsp70 and the cognate Hsc70 proteins belong to a same family of proteins, and are encoded by distinct genes with some homologies (e.g. human *Hsc70* demonstrated up to 80% homologies with human *Hsp7A1*). In many cell types, Hsc70 is constitutively expressed and insensitive to stress, whereas Hsp70 is highly sensitive to stress. In *Xenopus Laevis* erythropoiesis, *hsp70* gene is constitutively transcribed at earlier stages of differentiation and heat shock-dependent at later stages (orthochromatic erythroblasts) (RS Winning and LW Browder, 128 (1):111-120, 1988 Dev Biol). To date, the expression and the role of Hsp70 are unknown in human erythropoiesis.

Supplementary methods**Reagents**

Antibodies used included those targeting GATA-1 (N1 and C20 for immunoblot; N6 for confocal immunofluorescence microscopy and immunoprecipitation), Lamin B (M20), Hsp27 (M20) and Actin (I19) from Santa Cruz, Bcl-X_L (610211) from BD Biosciences, GPA (555569) from BD Pharmingen, Hsp70 (SPA-812), Hsp90 (SPA-830) and Hsc70 (SPA-815) from Stressgen Laboratories, activated caspase-3 from Cell signaling (#9661) for confocal microscopy and from Neomarkers (RB-1197) for immunoblotting. TO-PRO-3 (T-3605) and Orange Sytox (S11368) were from Molecular Probes, anti-rat-cy3 (712-166-153) and rabbit-cy5 (111-175-144) from Jackson ImmunoResearch, and rat immunoglobulin G (R 5005) from Sigma. Leptomycin B was a gift from Dr. A Benmerah, (Cochin Institute, Paris).

In vitro generation of erythroid cells.

Umbilical cord blood units from normal full-term deliveries were obtained, after informed mothers' consent, from the Obstetrics Unit of Hôpital Necker-Enfants Malades. CD36⁺ erythroid progenitors, generated from 7 days IL-6 (100 ng/ml) +IL-3 (10 ng/ml) +SCF (100 ng/ml)-cultured CD34⁺ progenitors isolated from cord blood (Miltenyi CD34 Progenitor Cell Isolation Kit), were cultured in the presence of IL-3 (10 ng/ml) + SCF (100 ng/ml) + Epo (2U/ml) in IMDM (Gibco cell culture) supplemented with 15% BIT 9500 (Stem Cell

Technologies) as described earlier [1]. After seven days of culture, apoptosis was induced by cytokines starvation (-Epo) during two (h2) or five (h5) hours.

Immunoblot analyses.

Cells were lysed in Laemmli buffer (whole cell lysates) or lysed 5 min on ice in a lysis buffer (0.2% NP40, 20mM Hepes pH7.9, 10mM KCl, 1mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM orthovanadate, 1mM PMSF, 1 mM DTT, and 10 μ g/ml of aprotinin/leupeptin/pepstatin) before centrifugation (2 min, 14,000 rpm) and supernatant collection (cytoplasmic extracts). Remaining pellets were lysed (350mM NaCl; 20% glycerol; 20mM Hepes pH 7.9; 10mM KCl; 1mM EDTA; 1mM orthovanadate, 1mM PMSF, 1mM DTT, and 10 μ g/ml of aprotinin/leupeptin/pepstatin), incubated for 30 min on ice and centrifuged for 20 min at 14,000 rpm before collecting the supernatant (nuclear extracts).

Whole lysates of 5×10^5 cells or 50 μ g of proteins of nuclear or cytoplasmic extracts were resolved on 12% acrylamide gels and analysed by immunoblotting. Antigens were visualized by chemiluminescence using SuperSignal West Dura (Pierce).

Generation of Hsp70 mutants

Recombinant Hsp70 was generated using the pET-16b vector system (Novagen) with induction of protein expression and subsequent Ni²⁺-affinity-purification according to the manufacturer's protocol. Mutants of Hsp70 lacking either the ATP (Δ ABD) or the peptide binding (Δ PBD) domain were generated through restriction enzyme cleavage and subsequent ligation of full-length Hsp70 cDNA in pET-16b vector. Δ ABD was generated through *Bgl*III digestion, creating an in-frame deletion of amino acids 119-426 comprising the ATPase domain. Δ PBD was generated through *Sma*I digestion, creating an in-frame deletion of amino acids 437-617 comprising the peptide-binding domain. After purification, all proteins had their His-tag removed and were subsequently buffer-exchanged to D-PBS.

Cell fractionation and immunoprecipitation

Protein-protein interactions between GATA-1 and Hsp70 were determined by immunoprecipitation (IP) experiments. Cell fractionation was performed by incubating the cells in ice-cold buffer [250mM sucrose, 20mM HEPES, 10mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM orthovanadate, 1mM PMSF, 1mM DTT, and 10 μ g/ml of aprotinin, leupeptin, pepstatin (pH 7.4)], then by homogenization in a Potter-Thomas

homogenizer. Nuclei were pelleted via a 10 min, 3,200 rpm spin and the supernatant (cytoplasm) was collected [2]. Nuclei and whole cells (obtained from 10^7 cells) were lysed on ice in an IP buffer (1% NP40, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 65mM Tris Hcl pH 8, 50mM Hepes, 3% glycerol, 1mM orthovanadate, 1mM PMSF, 1mM DTT, and 10 μ g/ml of aprotinin, leupeptin, pepstatin) for 20 min, then spun at 14,000 rpm for 30 min and the supernatant was collected. Nuclei or whole cell lysates were incubated on ice for 1.5 hours with either an anti-GATA-1 (2 μ g) or and anti-Hsp70 (1/100) antibody in the presence of 50 μ l Protein G Microbeads (Miltenyi). The immune complex was immobilized to a μ Column, isolated according to the manufacturer's instructions and analyzed by immunoblotting.

In vitro GATA-1 cleavage assays

GATA-1 and PARP cDNAs subcloned in PET21 plasmid in frame with amino-terminal T7 tag (GATA-1-PET, PARP-PET) (kindly provided by Dr De Maria and A Zeuner, Roma, Italy) were transcribed by using the In Vitro Translation Kit (L4610) from Promega in the presence of [35 S]-methionine (Amersham Biosciences). Two μ l of GATA-1 or PARP translation reaction were preincubated with either human recombinant Hsp70 (NSP-555) (0 to 1 μ g) or Hsp90 (SPP-770) (1 μ g) from Stressgen Laboratories and Hsp70 mutants (Δ ABD or peptide Δ PBD) in a stoichiometric manner (\sim 1 μ g HSP70) for 40 minutes at room temperature in buffer (25mM Hepes, 0.1% Chaps, 5mM DTT, 1mM EDTA, PH7.5) in a final volume of 15 μ l, then incubated for 1h at 37 $^{\circ}$ C with 70ng recombinant caspase-3 in a final buffer volume of 25 μ l. Reaction products were run on 10% acrylamide gel, and GATA-1 and PARP products were analyzed by autoradiography of dried gel.

Hsp70 siRNAs.

All siRNAs were obtained from Qiagen, and included a non-silencing Alexa Fluor 488 labeled siRNA, a specific siRNA for inducible Hsp70 (CTG GCC TTT CCA GGT GAT CAA); a scramble siRNA (CAG TAA TTG CAC CCG TCG TGT). Stealth siRNA for Hsp70 (ACU UCG UGG AGG AGU UCA AGA GAA A) and a control stealth siRNA (Block-iT, manufacturer's confidential sequence) were obtained from Invitrogen, life technologies.

Transfection of HeLa cells.

HeLa cells were infected with viral particles containing GFP-tagged GATA-1 vector [3] and GFP-positive cells were selected by cell sorting using a Coulter EPICS EPS (Beckman

Coulter). Twenty-four hours after seeding, these cells were transfected with either wild type or mutated Hsp70 constructs (subcloned in pcDNA3 vector) using the Superfect transfection reagent (Qiagen, Valencia, CA) following the manufacturer's instructions, and analyzed 48 hours later.

Transfection of hematopoietic progenitors.

2×10^6 of five days IL-6 (100 ng/ml) +IL-3 (10 ng/ml) +SCF (100 ng/ml)-cultured CD34⁺ cells were transfected in a Human CD34 Cell Nucleofector buffer with 10 μ g of siRNA using a Nucleofector (Amaxa Biosystems) according to the manufacturer's protocol. Cells were then cultured for 1 day with IL-6+IL-3+SCF. Thereafter, dead cells were removed with Dead Cell Removal Kit (Miltenyi). Transfection efficiency of the non-silencing Alexa Fluor 488 labeled siRNA was examined by FACS analysis (>90% of viable cells) (data not shown). Remaining alive cells were cultured with Epo+IL-3 in serum-free medium.

Production of retroviral particles and infection of haematopoietic progenitors.

Wild-type (WT) and mutated GATA-1 (μ GATA-1) cloned in PINCO vector [3] were transfected in the amphotrophic packaging cell-line PLAT-A (kindly provided by Pr Toshio Kitamura, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan) and supernatants containing viral particles were collected 48 h after transfection. CD34⁺ cells exposed to SCF (100 ng/ml), IL-3 (60 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml) and TPO (100 ng/ml) were daily infected during 72h, after 24h of culture. After three additional days of culture without TPO, siRNA were transfected 24h later after last infection. Finally, cells were grown in serum-free medium supplemented with IL-3 (0.01 U/ml) and Epo (3 U/ml). GFP-positive cells were sorted 24 h after siRNA transfection using a FACS VANTAGE cell sorter (Becton Dickinson).

Cell permeabilization and labelling for Fluorescence microscopy

5×10^4 cells were washed, spin on slides, acetone fixated, hydrated with cold 1X PBS/1% BSA for 30 minutes, treated with formaldehyde (Sigma) for 15 minutes, then with methanol (Prolabo) for 10 minutes at room temperature. Cells were then permeabilized with 1X PBS/0.2% Triton X100 (Sigma) for 10 minutes at 4°C, washed with 1X PBS/1% BSA and incubated in 3% BSA for 30 min. They were then sequentially incubated with antibodies diluted in 1XPBS/1% BSA/0.1% Tween (Sigma): anti-GATA-1 overnight at 4°C; then anti-rat-Cy3 for 45 minutes at room temperature, then rabbit anti-Hsp70 or anti-caspase-3 for 1 hour at room temperature, then anti-rabbit Cy5 for 45 minutes at room temperature. Nuclei

were stained with TO-PRO-3, and slides were examined with a confocal laser microscope (LSM 510 Carl Zeiss).

Fresh normal bone marrow cells were separated by centrifugation on Ficoll, spin on slides and fixed with acetone. Permeabilization and labelling with anti-GATA-1 and anti-Hsp70 antibodies was performed as above. Then, the cells were incubated for 1 hour at room temperature with anti-GPA antibody and DNA was stained with Orange Sytox for 5 min at room temperature before confocal laser microscope observation.

Supplementary figure legends

Figure 1S. Role of caspases in erythropoiesis regulation. A- Caspase-3 is required for terminal erythroid maturation. Erythropoiesis is a multistep process that involves the sequential formation of proerythroblasts (ProE) and basophilic (Baso), polychromatic (Poly) and orthochromatic (Ortho) erythroblasts leading to red cells (RC) production. During maturation of erythroblasts, caspase-3 is activated and its inhibition results in erythroid differentiation arrest at the proerythroblast stage. B- Patterns of caspase-3-induced proteolysis during apoptosis and differentiation of erythroid cells. During both apoptosis and differentiation, caspase-3 cleaves several targets involved in nucleus and chromatin condensation. In contrast, GATA-1 is protected from caspase-3 proteolysis during erythroid differentiation. GPA (glycophorin A), Hb (hemoglobin), Epo (erythropoietin).

Figure 2S. Caspase 3 is the main caspase activated in the nucleus of erythroblast during erythroid differentiation.

Immunoblot analysis of caspases 3, 6, 7, 8, 9 activation in nucleus and cytoplasm extracts of CD36⁺ cells cultured for 7 days in the presence of Epo+IL-3+SCF and then Epo-starved (-Epo) or not (+Epo) for 5 hours. Cleavage fragments of caspase-3, suggesting activation, and the proform of caspase-7 (without cleavage fragments) were detected in the nucleus. Caspase 6, or caspase 8 were not identified in the nucleus.

Figure 3S. Nuclear colocalization of Hsp70 and GATA-1 in GPA positive cells from fresh normal human bone-marrow.

Expression analysis by confocal microscopy in normal fresh bone-marrow cells of a- GPA (blue), GATA-1 (red) and Hsp70 (green). White hue shows GATA-1 and Hsp70

colocalization. **b-** GPA (blue), Hsp70 (green), DNA (yellow). **c-** Morphologic analysis after May Grunwald staining (MGG).

Figure 4S. Ability of Hsp70 interaction with GATA-1 is not affected by Epo starvation.

CD36⁺ cells cultured for 7 days in the presence of Epo+IL-3+SCF and then Epo-starved (-Epo) or not (+Epo) for 5 hours. Nuclear proteins were immunoprecipitated using an anti-GATA-1 antibody, then immunoblotted for indicated proteins. A 5-fold increase in the input of nuclear extract from cells starved of Epo (h5x5) is compared to non starved cells (d7).

Figure 5S. Before caspase activation, decrease in nuclear Hsp70 content is not associated with GATA-1 degradation.

After 5 days of culture in the presence of IL-3+IL-6+SCF, CD34⁺ progenitors were transfected with 10 µg of a siRNA targeting Hsp70 (siRNA Hsp70) or a scrambled siRNA (siRNA control). Two days after transfection, cells were diluted to 4.10⁵ cells/ml, and then cultured in the presence Epo+IL-3 for 2 days. Immunoblot analysis of indicated proteins in nuclear and cytoplasmic extracts is shown (see also figure 3b, day 2).

Figure 6S. Decreased Hsp70 content induces death of erythroblasts undergoing differentiation.

After 5 days of culture in the presence of IL-3+IL-6+SCF, CD34⁺ progenitors were transfected with 10 µg of an antisense targeting Hsp70 or a control antisense. Two days after transfection, cells were diluted to 4.10⁵ cells/ml, then cultured in the presence Epo+IL-3 for indicated times (days). **a-** Growth curves. **b-** Percentage of cell death. **c-** Percentage of mature cells. **d-** Percentage of mature cells exhibiting morphological features of apoptosis. Results are the mean +/- SD of 3 independent experiments. * p < 0.05. **e-** Immunoblot analysis of Hsp70 in whole cell lysate at day 2 of culture (d2). The non-inducible Hsc70 is used as loading control.

Figure 7S. Decreased Hsp70 content induces death of erythroblasts undergoing differentiation even in the presence of SCF.

After 5 days of culture in the presence of IL-3+IL-6+SCF, CD34⁺ progenitors were transfected with 10 µg of an siRNA stealth targeting Hsp70 or a control siRNA stealth. Two days after transfection, cells were diluted to 4.10⁵ cells/ml, then cultured in the presence Epo+IL-3 and in the presence of SCF for indicated times (days). **a-** Growth curves. **b-**

Percentage of cell death. **c-** Percentage of mature cells. **d-** Percentage of mature cells exhibiting morphological features of apoptosis. Results are the mean \pm SD of 3 independent experiments. * $p < 0.05$. **e-** Immunoblot analysis of Hsp70 in whole cell lysate at day 2 of culture (d2). The non-inducible Hsc70 is used as loading control.

Figure 8S. Model of GATA-1 protection from caspase-3-induced cleavage by Hsp70 during erythroid differentiation.

Supplementary references

1. Zermati, Y., et al., *Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors*. *Exp Hematol*, 2000. **28**(8): p. 885-94.
2. Gurbuxani, S., et al., *Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells*. *Oncogene*, 2001. **20**(51): p. 7478-85
3. De Maria, R., et al., *Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1*. *Nature*, 1999. **401**(6752): p. 489-93

Fig 1S

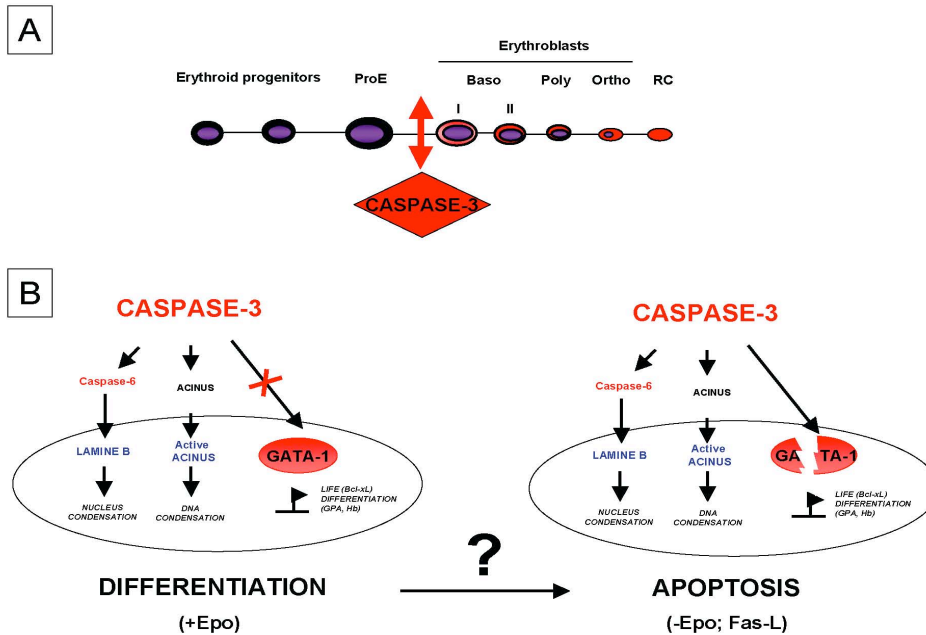


Fig 2S

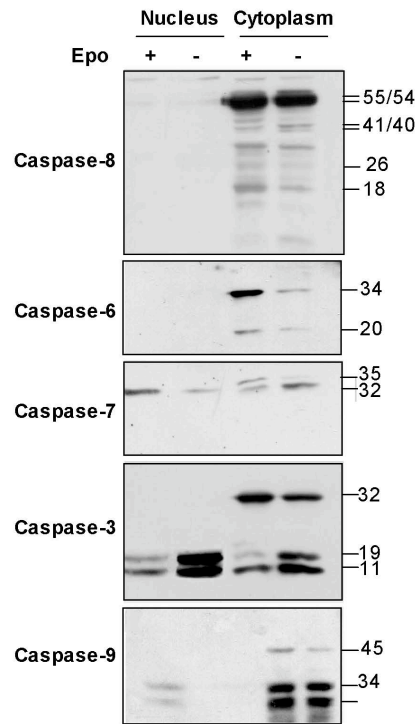


Fig 3S

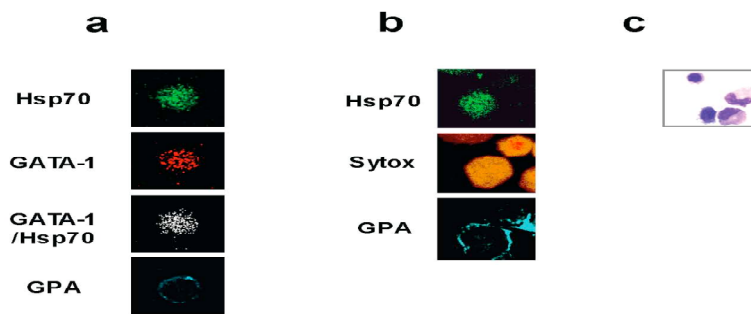


Fig 4S

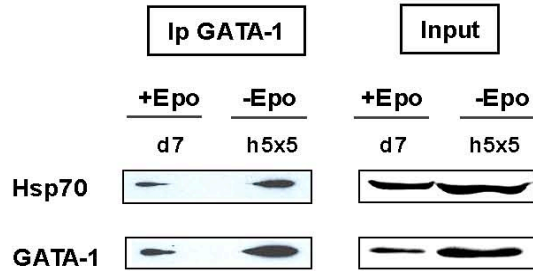


Fig 5S

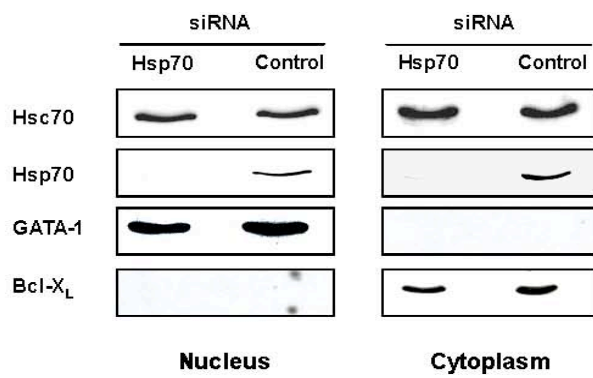


Fig 6S

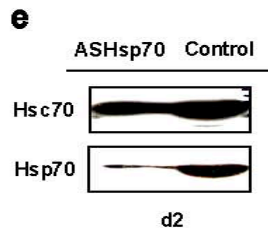
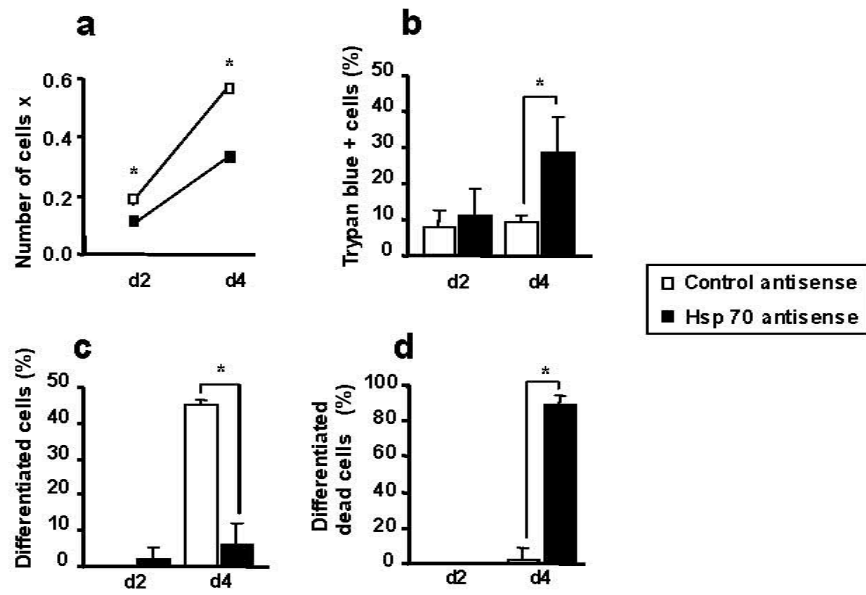


Fig 7S

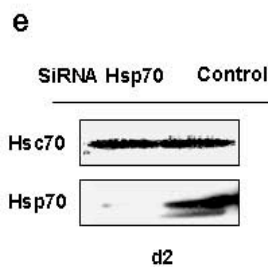
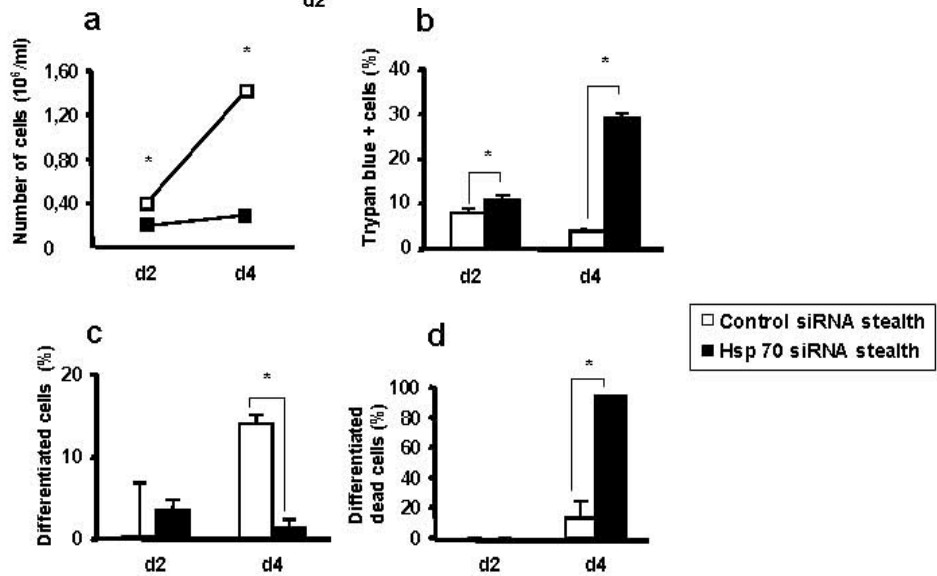
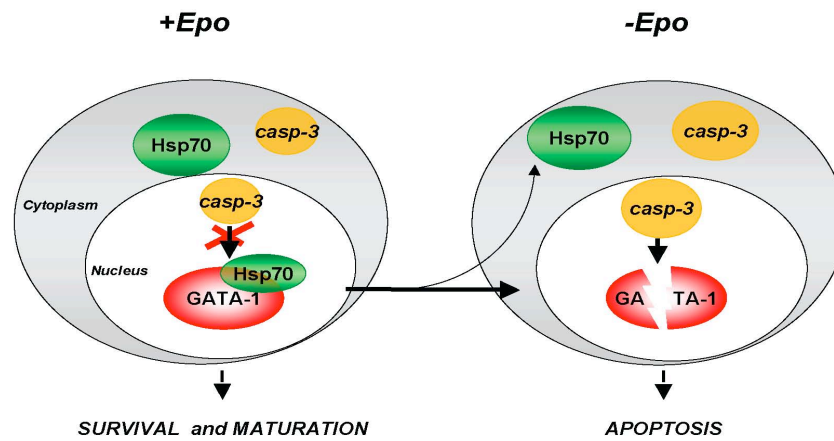


Fig 8S



1.3 Conclusions article 1

Dans les érythroblastes en cours de maturation, la caspase-3 est activée transitoirement sans induction de l'apoptose. Nos résultats montrent que ce phénomène est en partie lié à Hsp70, connue pour réguler le repliement, l'activité et la dégradation de protéines. Dans ce travail, nous montrons qu'Hsp70 a aussi une fonction dans la maturation érythroïde et plus particulièrement, dans la protection de GATA-1 du clivage par la caspase-3 activée au cours de la différenciation érythroblastique.

Dans un premier temps, nous avons montré que l'expression d'Hsp70 est physiologique et non pas la conséquence d'un stress induit par la mise en culture. Parmi des cellules non cultivées issues de prélèvements de moelles normales, les cellules érythroïdes médullaires expriment Hsp70. Depuis vingt ans, plusieurs groupes ont noté qu'Hsp70 est fortement exprimée dans les précurseurs érythroïdes et ce, de manière basale, même en l'absence de choc thermique ^{322,323,324,325,326,327}. L'expression d'Hsp70 au cours de la différenciation érythroïde terminale est peut-être régulée par GATA-1 puisque dans la lignée K562, GATA-1 se fixe sur le promoteur d'Hsp70, permettant ainsi l'expression de la protéine anti-apoptotique ³²⁸.

Nos résultats indiquent que dans les érythroblastes primaires, Hsp70 est localisée dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau où elle interagit avec GATA-1. *In vitro*, un mutant d'Hsp70 dépourvu de son site de liaison peptidique (PBD) n'interagit plus avec GATA-1. Par test de clivage *in vitro*, nous avons montré qu'Hsp70 et non Hsp90 protège GATA-1 du clivage par la caspase-3. A l'inverse, lors de la privation des érythroblastes en Epo, Hsp70 est délocalisée du noyau vers le cytoplasme, induisant ainsi la perte de protection de GATA-1 et son clivage par la caspase-3 activée, ce qui conduit à la mort des cellules par apoptose.

L'inhibition d'expression d'Hsp70 par siRNA dans des progéniteurs érythroïdes humains entraîne le clivage de GATA-1 au moment de l'activation de la caspase-3. Ceci induit une diminution des gènes régulés par GATA-1, incluant l'hémoglobine et la protéine Bcl-X_L et a pour conséquence l'arrêt de différenciation et l'induction d'apoptose. Cette apoptose est spécifique du clivage de GATA-1 et n'est pas liée à une altération plus globale du métabolisme cellulaire puisqu'un mutant de GATA-1 non clivable par la caspase-3 est capable de réverser le phénotype lors de l'inhibition d'Hsp70 par siRNA. Dans ce modèle, l'Epo détermine le sort des érythroblastes (apoptose versus différenciation) en aval de l'activation de la caspase-3 en régulant la localisation d'Hsp70 (cytoplasmique versus nucléaire et cytoplasmique). Une étude dans la lignée humaine TF1 montre également un rôle d'Hsp70 au cours de la différenciation érythroïde, mais cette fois, en amont de la caspase-3. Lors de la différenciation induite par l'Epo, Hsp70 lie et séquestre AIF dans le cytosol limitant ainsi son activité apoptotique³⁰⁵.

2 Le SCF régule la localisation d'Hsp70 au cours de la différenciation érythroïde terminale normale et pathologique.

2.1 Contexte scientifique et situation du projet

L'érythropoïèse est régulée positivement par deux facteurs indispensables à la prolifération et la survie des progéniteurs érythroïdes, le SCF pour les phases précoces jusqu'au stade CFU-E et l'Epo à partir des CFU-E jusqu'au stade des érythroblastes ⁷. Le SCF agit sur son récepteur c-Kit, un récepteur à tyrosine kinase, et induit des signaux intracellulaires essentiellement de survie et de prolifération pour les progéniteurs érythroïdes. L'activation de la PI3-K par c-Kit est sans doute une des voies principales pour permettre la prolifération et la survie, par l'intermédiaire de la phosphorylation de la protéine AKT ²⁰³.

Au cours de la différenciation érythroïde terminale, notre équipe a mis en évidence qu'Hsp70 est un nouvel acteur essentiel grâce à son interaction avec une de ces cibles des caspases. Hsp70 joue un rôle anti-apoptotique majeur en empêchant le clivage de GATA-1 par la caspase-3 activée transitoirement lors de la maturation érythroïde. De façon intéressante, nous avons observé qu'au début de la différenciation érythroïde terminale, Hsp70 est majoritairement localisée dans le cytoplasme. A partir du stade d'érythroblaste basophile, lors de la phase d'activation des caspases, Hsp70 s'accumule dans le noyau où elle protège GATA-1 du clivage par la caspase-3 ³²⁹.

Dans cette seconde partie de ma thèse, le but était de déterminer par quel mécanisme Hsp70 s'accumule dans le noyau des érythroblastes basophiles. Il est connu que l'expression de c-Kit est diminuée au stade d'érythroblastes basophile ⁷⁷ ce qui concorde avec l'accumulation nucléaire d'Hsp70. Nous avons donc émis l'hypothèse que la modulation de l'expression de c-Kit pouvait être responsable de la localisation subcellulaire d'Hsp70.

Au-delà de l'érythropoïèse normale, nous avons également voulu vérifier si notre modèle pouvait s'étendre à une pathologie érythroïde. Nous avons étudié le syndrome myélodysplasique (SMD) de bas grade qui s'accompagne d'un arrêt de maturation et d'une apoptose des érythroblastes, un phénotype similaire à celui observé dans les érythroblastes invalidés pour Hsp70.

2.2 c-Kit down regulation is essential for proper Hsp70 nuclear accumulation and terminal erythroid differentiation.

Vandekerckhove Julie[°], Frisan Emilie[°], De Thonel Aurélie, Gabet Anne-Sophie, Verdier Frédérique, Courtois Geneviève, Coulon Séverine, Zermati Yael, Ribeil Jean-Antoine, Kersual Joelle, Solary Eric, Mayeux Patrick, Garrido Carmen, Fontenay Michaela* and Hermine Olivier*

[°]premiers co-auteurs

*derniers co-auteurs

Manuscrit en préparation.

**c-Kit down regulation is essential for proper Hsp70 nuclear accumulation
and terminal erythroid differentiation.**

Vandekerckhove Julie ^{1o}, Frisan Emilie ^{2,3,4o}, De Thonel Aurélie ^{5,6}, Gabet Anne-Sophie¹,
Verdier Frédérique^{2,3,4}, Courtois Geneviève ¹, Coulon Séverine¹, Zermati Yael ^{2,3}, Ribeil Jean-
Antoine ¹, Kersual Joelle ¹, Solary Eric ^{5,6,7}, Mayeux Patrick^{2,3,4} Garrido Carmen^{5,6,7}, Fontenay
Michaela ^{2,3,4*} and Hermine Olivier ^{1,8*}

¹ Université René Descartes Paris V, CNRS UMR 8147 et IFR Necker, 75270 Paris, France.

² Institut Cochin, Département d'Hématologie, Paris, France

³ INSERM, U567, Paris, France

⁴ Université Paris Descartes, Faculté de Médecine and Université René Descartes, UMR-S
8104, Paris, France

⁵ INSERM U866, ⁶ Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Burgundy, Dijon 21000,

⁷ CHU Dijon BP1542, Dijon, France

⁸ Department of Hematology and Centre de Référence des Mastocytoses, Faculté de Médecine
et Université René Descartes, Assistance publique des hôpitaux de Paris, Necker, 75270 Paris,
France.

^oBoth authors contributed equally to this work

*Both authors co-directed this work

Condensed title: Hsp70 nuclear accumulation and c-Kit down regulation

Corresponding authors: Michaela Fontenay and Olivier Hermine

Hôpital Necker- CNRS UMR 8147

161 rue de Sèvres, 75743- Paris Cedex 15- France

Phone: 33 1 44 49 06 75

Fax: 33 1 44 49 06 76

e-mail: fontenay@cochin.inserm.fr or ohermine@gmail.com

Abstract:

Transient caspase-3 activation is required to complete terminal erythroid differentiation. Nevertheless, in erythroid precursors, caspase -3 activation does not lead to apoptosis. This is due to the fact that the transcription factor GATA-1 is protected from caspase-3-mediated cleavage by the chaperone protein Hsp70. In this context, GATA-1 can promote the expression of anti-apoptotic as well as pro-differentiation genes. Interestingly, GATA-1 expression appears to be impaired in erythroid cells from MDS patient. These observations underly the importance of GATA-1 integrity and by extension, of Hsp70 cellular localization during the erythropoiesis process. However, up to date, nothing was known about the mechanisms regulating the trafficking of Hsp70 in erythroblasts.

Using primary erythroblast cells, we demonstrate that during the early steps of erythroid differentiation, the serine 400 residue of Hsp70, located in its NES, is phosphorylated via AKT after SCF activation of its receptor c-Kit. This phosphorylation results in nuclear export of the Hsp70 protein into the cytoplasm. Progressively, c-Kit expression and AKT activation decrease leading to the accumulation of the S400 unphosphorylated form of Hsp70 into the nucleus. Thus, at the basophilic stage, Hsp70 can interact with GATA-1 and protect it from caspase-3 proteolysis. This model was confirmed by analysing c-Kit expression and Hsp70 localization in low grade MDS blasts. Indeed, we show here that MDS cells, Hsp70 accumulate into nucleus leading to GATA-1 cleavage, resulting in apoptosis and differentiation arrest.

All together our results supports the fact that Hsp70 is a key regulator of the erythroid differentiation process and that Hsp70 activity can be impaired in pathological context.

Introduction:

Erythropoiesis is a multistep process leading to red cell production. This process is regulated by number of growth factors, among which stem cell factor (SCF) and erythropoietin (Epo). Studies performed with mutant mice lacking the normal expression of SCF or its receptor c-Kit or Epo receptor (EpoR), exhibit severe defects in erythroid development and die of anaemia¹⁻³. There is a continuous cellular process from the earliest BFU-E depending mainly from SCF⁴ to the latest CFU-es requiring Epo for survival⁵. First, c-Kit is highly expressed on the cell surface of BFU-E but progressively decrease from the CFU-E to finally disappear at the basophilic erythroblasts stages⁶. The role of the c-Kit receptor on erythroid progenitors is to mediate SCF stimulatory effects on cell survival and proliferation and to transmit the SCF inhibitory effect on cell differentiation⁷. The binding of SCF to c-Kit initiates a series of intracellular signalling cascade involving phosphatidylinositol 3-kinase p85 subunit (PI-3Kinase)/AKT but also the Ras GTPase activating protein, SHP2 phosphatase and Src kinases⁸⁻¹⁰. Later, CFU-E progenitors express markedly less c-Kit protein but increased cell surface Epo receptor (EpoR) compared with earlier BFUe progenitors. In that context, Epo stimulation of the EpoR is essential for the survival and differentiation of these cells^{3, 11}. EpoR belongs to class I cytokine receptor family, and initiates signalling by activating Janus kinase (JAK) 2¹². Activated JAK2 phosphorylates the EpoR which results in the recruitment and activation of Stat5a/b, p85 α regulatory subunit of PI-3Kinase, Lyn tyrosine kinase, SHP1, SHP2, SHIP, and suppressor of cytokine signalling (SOCS)¹³⁻¹⁷. Subsequently, Stat5, in cooperation with the main erythroid transcription factor GATA-1, stimulates the expression of pro- differentiation and anti-apoptotic proteins¹⁸, allowing erythroid cell maturation. Thus, CFUe give rise to the first morphologically identifiable cell of the erythrocyte lineage the proerythroblast, which then differentiates successively into the basophilic erythroblast, the polychromatophilic erythroblast and the acidophilic erythroblast, which is the latest nucleated cell of the mammalian erythrocyte lineage.

Transient caspase-3 activation is required to cleave several target proteins implicated in morphological changes associated terminal erythroid differentiation like nucleus and chromatin condensation¹⁹. Despite such a context of caspase-3 activation, erythroid precursors appears to be protected from apoptosis. We have shown that this is due to GATA-1 protection by the chaperone protein Hsp70. Indeed, at the onset of caspase-3 activation, Hsp70 translocates into the nucleus and interacts with the transcription factor GATA-1 to protect it from caspase-3 cleavage. Hsp 70 mediated GATA-1 protection allows the

expression of the anti-apoptotic Bcl-xL protein and several differentiation markers leading ultimately to enucleation²⁰.

MDS comprise a heterogeneous group of disorder of hematopoietic stem cells characterized by a hypercellular bone marrow with several morphologic features of dysplasia, associated with peripheral blood cytopenias affecting red blood cells, granulocytes and platelets. The new OMS classification that shares MDS according to number of blasts in bone marrow and cytogenetics abnormalities²¹ allows separation of low risk MDS with less than 10% medullary blasts and high risk MDS with blasts between 11 and 19%. The MDS frequently evolves to acute myeloid leukaemia (AML). Common features of low risk MDS (refractory anemia (RA), 5q- syndromes, refractory anemia with ring sideroblasts (RARS), refractory anemia with excess blasts (RAEB) and refractory anemia with less than 10% medullary blasts (RAEB-1)) are excessive apoptosis of hematopoietic precursors in the bone marrow²², abnormal growth of erythroid progenitors such as erythroid burst-forming units (BFU-Es) and erythroid colony-forming units (CFU-Es) and dysplasia of erythroid cells. Interestingly, low grade MDS shares similar features with symptoms displayed by Gata^{+/-} mice²³. Moreover, it appears that low grade MDS are associated with GATA-1 decreased expression. GATA-1 downregulation is responsible for differentiation arrest and increased apoptosis of low grade MDS erythroblasts since exogenous expression of GATA-1 resistant to caspase-3 cleavage rescued erythroid differentiation of these cells (manuscript in preparation). These data highlight the importance of GATA-1 expression during terminal erythroid differentiation and by extension, the crucial involvement of Hsp70 nuclear accumulation at the onset of caspase 3 activation to mediate GATA-1 protection. However, a remaining question had to be addressed: how is Hsp70 cellular localization regulated during the erythroid differentiation process?

In this study, we demonstrate that Hsp70 localization is post-translationally regulated by AKT phosphorylation following SCF binding to c-Kit. This phosphorylation promotes the nuclear export of the chaperone. Thus, Hsp70 displays a weak nuclear/cytoplasmic localization at the BFU-E stage. Latter at the CFU-E stage, decreased c-Kit expression leads to a downregulation of Hsp70 phosphorylation by AKT. In this context, unphosphorylated form of Hsp70 accumulates in the nucleus of erythroid precursors where it can protect GATA-1 from caspase-3-mediated cleavage. This model is consistent with what we observe in low grade myelodysplastic syndromes. Indeed, we show that low grade MDS cells display long term c-Kit overexpression leading to Hsp70 nuclear export defect and as a consequence, caspase-3 mediated GATA-1 degradation, apoptosis and a differentiation arrest.

Material and method

In vitro generation of erythroid cells.

Umbilical cord blood units from normal full-term deliveries were obtained, after informed mothers' consent, from the Obstetrics Unit of Hôpital Necker-Enfants Malades. CD36⁺ erythroid progenitors, generated from 7 days IL-6 (100 ng/ml) +IL-3 (10 ng/ml) +SCF (100 ng/ml)-cultured CD34⁺ progenitors isolated from cord blood (Miltenyi CD34 Progenitor Cell Isolation Kit), were cultured in the presence of IL-3 (10 ng/ml) + SCF (100 ng/ml) + Epo (2U /ml) in IMDM (Gibco cell culture) supplemented with 15% BIT 9500 (Stem Cell Technologies).

MDS Patients and controls

Patients with low grade MDS were tested, including refractory anemia or refractory cytopenia (RA/RC) and RAEB with less than 10% blast cells, as referred to the WHO classification. All patients were at diagnosis or received only supportive care with blood transfusion. MDS and normal bone marrow samples from volunteers were obtained by sternal aspiration. Normal CD34⁺ cells were also purified from peripheral blood cytapheresis. All patients and volunteers were informed and gave their consent according to the recommendations of the local ethics committee.

In-vitro culture of MDS erythroid progenitors

For erythroid cell expansion, CD34⁺ cells were isolated from the mononuclear cell fraction of bone marrow samples or cytapheresis products using the MidiMacs system (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). CD34⁺ cells, which purity was higher than 85%, were cultured at 0.5×10^6 /mL for 14 days in IMDM containing 20% BIT 9500, 10^{-4} M, penicillin/streptomycin, rHuEpo 1 UI/mL, SCF 50 ng/mL, IGF-1 40 ng/mL and dexamethasone 10^{-6} M. Cells were diluted every 2 days in the same medium until day 10. From day 10 to 14, cells were switched to Epo (1 UI/mL) and insulin (1 UI/mL) to obtain terminal erythroid differentiation.

Cell Proliferation, differentiation and apoptosis assay

Throughout the culture, cell differentiation was assessed by morphological analysis of cells after cytocentrifugation and May-Grünwald Giemsa coloration, and by analysis of

glycophorin A and hemoglobin expression by flow cytometry and benzidine staining, respectively. Cell proliferation was assessed by counting cells every day after trypan blue dye exclusion staining. Apoptosis was assessed by annexin V binding and propidium iodide (PI) staining

Immunoblot analyses.

Cells were lysed in Laemmli buffer (whole cell lysates) or lysed 5 min on ice in a lysis buffer (0.2% NP40, 20mM Hepes pH7.9, 10mM KCl, 1mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM orthovanadate, 1mM PMSF, 1 mM DTT, and 10 μ g/ml of aprotinin/leupeptin/pepstatin) before centrifugation (5 min, 14,000 rpm) and supernatant collection (cytoplasmic extracts). Remaining pellets were washed with PBS1 mM orthovanadate then lysed (350mM NaCl; 20% glycerol; 20mM Hepes pH 7.9; 10mM KCl; 1mM EDTA; 1mM orthovanadate, 1mM PMSF, 1mM DTT, and 10 μ g/ml of aprotinin/leupeptin/pepstatin), incubated for 30 min on ice and centrifuged for 20 min at 14,000 rpm before collecting the supernatant (nuclear extracts). Whole lysates of 5 x 10⁵ cells or 50 μ g of proteins of nuclear or cytoplasmic extracts were resolved on 12% acrylamide gels and analysed by immunoblotting. Antigens were visualized by chemiluminescence using SuperSignal West Dura (Pierce).

CD36 cell fractionation and immunoprecipitation

Protein-protein interactions between Hsp70 and AKT or Lyn were determined by immunoprecipitation (IP) experiments. Cells were lysed 30 min on ice in a lysis buffer [20mM Tris, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 0.1% NP40, 1mM orthovanadate, 10mM NaF, 1mM PMSF, and 10 μ g/ml of aprotinin, leupeptin, pepstatin) then spun at 14,000 rpm for 10 min and the supernatant was collected. Cell lysates were incubated on ice for 1 hour with 2 μ g of either an anti-Hsp70 (rabbit) or anti-AKT (mouse) antibody precoupled to 40 μ l Protein A and Protein G Microbeads (GE Healthcare). The immune complex was analyzed by immunoblotting.

Generation of Hsp70 mutants

The mutant constructs of HSP70, S400A, S400D, Y524PheA and Y452D were done by directed mutagenesis following the instruction of the supplier (Stratagen's QuickChange II site directed mutagenesis Kit, Agilent technology, Massy, France). The pcdna3 HSP70WT plasmid was used as a template for the annealing of the following mutagenic oligonucleotides:

S275A reverse primer (5' CTG GGT GCT GGA CGC CAG GGT CCT CT 3'), forward primer (5' AG AGG ACC CTG GCG TCC AGC ACC CAG 3'), S275D reverse primer (5' GGC CTG GGT GCT GGA ATC CAG GGT CCT CTG 3'), forward primer (5' CAAG AGG ACC CTG GAT TCC AGC ACC CAG GCC 3'), S400A reverse primer (5' TG GAC GTG GCT CCC CTG GCG CTG GG 3'), forward primer (5' CC CAG CGC CAG GGG AGC CAC GTC CA 3'), S400D reverse primer (5' TG GAC GTG GCT CCC CTG GAC CTG GGG CTG AC 3'), forward primer (5' GT CAG CCC CAG GTC CAG GGG AGC CAC GTC CA 3')

Transfection of 293T cells.

293T cells were cultured in DMEM (Gibco cell culture) supplemented with 10% serum (Biowest, Abcys), PS and Glut. One day before transfection, $2,5 \times 10^6$ cells were plated in DMEM without antibiotics. Confluent cells were transfected with 20 μg of wild type or mutated Hsp70 constructs (subcloned in pcDNA3 vector) or MYR-EGFP-AKT1* cDNAs subcloned in PcDNA3 plasmid (kindly provided by Dr Letard and Dubreuil, Marseille, France) or Lyn Y508F cDNAs subcloned in pCDNAIAmp plasmid (kindly provided by Pr De P. Klinken, Pearth, Australia) in Opti-MEM (Gibco cell culture) without serum using lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions, and analyzed 48 hours later.

293T cell fractionation and immunoprecipitation

Protein-protein interactions between HA tagged-Hsp70 and AKT or Lyn and phosphorylation of HA tagged-Hsp70 by AKT or Lyn were determined by immunoprecipitation (IP) experiments. Transfected cell were lysed 30 min on ice in a lysis buffer (50mM Tris (pH8,0), 150mM NaCl, 1% Triton) then spun at 10,000 rpm for 10 min at 4°C and the supernatant was collected. Cell lysates were incubated on ice for 30 min with 50 μl of anti-HA Microbeads Microbeads (Miltenyi) and separate on μcolumn following the manufacturer's instructions (μMACS Epitope Tag Protein isolation kit, Miltenyi). The immune complex was analyzed by immunoblotting.

Transfection of hematopoietic progenitors.

4×10^6 of six days Epo (2UI/ml) +IL-3 (10 ng/ml) +SCF (100 ng/ml)-cultured CD34⁺ cells were transfected in a Human CD34 Cell Nucleofector buffer with 5 μg of plasmid using a Nucleofector (Amaxa Biosystems) according to the manufacturer's protocol. Cells were then cultured for 1 day with Epo+IL-3+SCF. Thereafter, dead cells were removed with medium

washes. Transfection efficiency of the non-silencing Alexa Fluor 488 labeled siRNA was examined by FACS analysis (>90% of viable cells) (data not shown). Remaining alive cells were cultured with Epo+IL-3+SCF in serum-free medium.

Cell permeabilization and labelling for Fluorescence microscopy

$5 \cdot 10^4$ cells were washed, spin on slides, acetone fixated, hydrated with cold 1X PBS/1% BSA for 30 minutes, treated with formaldehyde (Sigma) for 15 minutes, then with methanol (Prolabo) for 10 minutes at room temperature. Cells were then permeabilized with 1X PBS/0.2% Triton X100 (Sigma) for 10 minutes at 4°C, washed with 1X PBS/1% BSA and incubated in 3% BSA for 30 min. They were then sequentially incubated with antibodies diluted in 1XPBS/1% BSA/0.1% Tween (Sigma): anti-GATA-1 overnight at 4°C; then anti-rat-Cy3 for 45 minutes at room temperature, then rabbit anti-Hsp70 for 1 hour at room temperature, then anti-rabbit Cy5 for 45 minutes at room temperature. Nuclei were stained with IP and slides were examined with a confocal laser microscope (LSM 510 Carl Zeiss).

Fresh normal bone marrow cells were separated by centrifugation on Ficoll, spin on slides and fixed with acetone. Permeabilization and labelling with anti-GATA-1 and anti-Hsp70 antibodies was performed as above. Then, the cells were incubated for 1 hour at room temperature with anti-GPA antibody and DNA was stained with Orange Sytox for 5 min at room temperature before confocal laser microscope observation.

Lentiviral production and MDS cell transduction

WT-Hsp70 and the nuclear mutant Hsp70-S400A were cloned in the pTripΔU3EF1αlentiviral vector upstream a IRES_{ECMV}-Green Fluorescent Protein (GFP) cassette. Infectious vector particles were produced in 293T cells by transient co-transfection with the p8.9 and the VSV-G encoding plasmids. The empty vector devoid of insert was used as control.

Vector particles were produced by lipofectamine2000 (Invitrogen)cotransfection of 293T cells by the vector plasmid, an encapsidation plasmid (p8.91) lacking all accessory HIV-1 proteins, and an expression plasmid (pHCMV-G) encoding the vesicular stomatitis virus (VSV) envelope. CD34+ cells were transduced twice with viral supernatants at day 1 and 2 after purification. On day 3, cells were washed twice and seeded in medium for erythroid culture.

Transduction efficacy was measured as the percentage of GFP-positive cells (FL1). Apoptosis and differentiation markers were always quantified in the GFP-positive population (FL1)

Results:

Decreased c-Kit expression and subsequent decreased AKT activation induced Hsp70 nuclear accumulation

c-Kit expression is decreasing during erythroid differentiation leading to a gradual loss of the SCF signalling. Interestingly we have found that, at day 3 of primary erythroblasts culture under SCF and Epo, Hsp70 is mainly localized into cytoplasm and a small fraction is nuclear (Hsp70 ratio N/C= 0,15). By contrast, at day 6, concomitantly with c-Kit down-modulation, Hsp70 is accumulated into nucleus (Hsp70 ratio N/C= 0,24 at day 6, 0,32 at day 8 and 0,42 at day 10) (figure 1A) without any protein stabilisation since total Hsp70 expression is constant in total cell lysate (figure 1B). This result suggests that c-Kit activation through SCF is involved in Hsp 70 nuclear localisation. In order to confirm this hypothesis, we mimicked c-Kit loss by SCF starvation at day 4 erythroblasts for 18 hours. Figure 1C shows that overnight SCF starvation induced Hsp70 nuclear accumulation.

This result confirms that Hsp70 subcellular localization is regulated through c-Kit signalling.

Downregulation of the AKT pathway through c-Kit loss is responsible for Hsp70 nuclear accumulation

After binding to its receptor c-Kit, the SCF activates a series of intracellular signalling cascades which the main one is the phosphatidylinositol 3-kinase p85 subunit (PI-3K)/AKT pathway. As already mentioned, along erythroid differentiation, Hsp70 nuclear accumulation coincides c-Kit downregulation but also with decreased phosphorylated AKT (Figure 1A). This observation suggests that the PI-3K/AKT pathway besides playing a key role in proliferation and survival, could also be involved in Hsp 70 cellular localization in erythroblasts. In attempt to confirm that c-Kit mediated activation of the PI3K/AKT pathway is involved in Hsp70 localization, day 4 normal primary erythroblasts were treated with 25 μ M of the PI3K inhibitor LY294002 and Hsp70 localization was evaluated by cellular fractioning and immunoblot analysis. Our results show that PI3K inhibition, as well as SCF starvation, induces Hsp70 nuclear accumulation (figure 1C).

Thus c-Kit, through PI3K/AKT activation, is involved in Hsp70 cytoplasmic localization and a decrease of PI3K/AKT signalling is responsible for Hsp70 nuclear accumulation at the basophilic stage of terminal erythroid differentiation process.

Hsp70 is a substrate for AKT phosphorylation

Since Hsp70 cellular localization appears to be related with the activation level of the PI-3K/AKT pathway, we tested the hypothesis that Hsp70 could be a direct substrate for the serine-threonine kinase AKT. We first tested the physical interaction between both proteins by immunoprecipitation assays and immunoblot analysis. Figure 2B shows that, when co-expressed in 293T, AKT coimmunoprecipitated with Hsp70. In addition, this interaction was also detected in primary cells cultured under SCF and Epo (figure 2C).

After testing for a direct interaction between both proteins, we assessed the possibility that AKT directly phosphorylates Hsp70. Previously, a proteomic study in mesangial cells identified Hsp70 as target of AKT phosphorylation²⁴. It has previously been shown that Hsp70 NES is highly conserved in the Hsp70 family proteins and allows the nuclear localization of Hsc54, a variant of Hsc70²⁵. Among the Hsp70 NES, we have identify two potential targets of AKT phosphorylation: the S400 and S275 residues (figure 2A). The two serines were substituted by alanine residues (Hsp70 S400A, and Hsp70 S275A) to block phosphorylation and independently co-expressed with an active myristoylated form of AKT (AKT*) in 293T cells. The AKT phosphorylation status of mutated HA-tagged Hsp70 proteins was evaluated using phospho-AKT substrate antibody after HA immunoprecipitation. As shown in figure 2B, active AKT induced phosphorylation of Hsp70 WT and Hsp70 S275A, suggesting that the S275 residue is not a target of AKT phosphorylation. By contrast, when the Hsp70 S400A expression vector was cotransfected with the active form of AKT, AKT induced phosphorylation of Hsp70 decreased significantly (Figure 2B).

All together, these data show that AKT directly interacts with Hsp70 and induces its phosphorylation on residue S400 located in the NES.

AKT induced nuclear export through NES phosphorylation.

To confirm the importance of Hsp70 S400 phosphorylation status on Hsp70 cellular localization, the wild-type (WT) or mutated HA-tagged Hsp70 proteins were immunodetected in primary erythroblasts. Primary erythroblasts cells were transfected with HA-tagged Hsp70 WT or mutated expression plasmids. Mutations corresponded to changes of serine residues either in alanine (Hsp70 S400A, Hsp70 S275A) to block phosphorylation, either in aspartate (Hsp70 S400D, Hsp70 S275D) to mimic constitutive phosphorylation. 48 hours post-transfection, Hsp70 was visualized by fluorescence microscopy using an HA

antibody. Under SCF treatment, HA-Hsp70 WT and Hsp70 S400A are localized both in the cytoplasm and the nucleus (nuclear/cytoplasmic HA fluorescence intensity of 1,2 and 1,7 respectively). In contrast, nuclear Hsp70 S400D localization is significantly decreased compared to Hsp70 WT (nuclear/cytoplasmic HA fluorescence intensity from 0,5 to 1,2 respectively) (figure 3). These results suggest that Hsp70 nuclear localisation depends on the dephosphorylated status of the S400. In order to determine whether the AKT mediated S400 phosphorylation of Hsp70 induce the nuclear export of the protein or a its cytoplasmic retention, we examined the leptomycin B (LMB: nuclear export inhibitor) effect on the subcellular localization of Hsp70 WT, S400A or S400D. Our results clearly show that the nuclear accumulation of Hsp70 WT or S400A is not increased when nuclear export was inhibited (nuclear/cytoplasmic HA fluorescence intensity from 1,2 to 1,2 and from 1,7 to 1,4 respectively). In contrast, LMB treatment significantly increases Hsp70 S400D nuclear localization (nuclear/cytoplasmic HA fluorescence intensity from 0,5 to 1,8) (figure 3). All together, these data suggest that Hsp70 is nuclear exported through S400 phosphorylation. A deregulation of Hsp70 shuttling between the cytoplasm and the nucleus of erythroid progenitors could be involved in the development of diseases. In particular, we can speculate that abnormal nuclear export of Hsp70 (due to constitutive AKT activation through c-Kit) promotes GATA-1 cleavage and subsequent maturation defect and apoptosis as observed in MDS.

Erythroblasts from myelodysplastic syndrome patients exhibited a weak Hsp70 nuclear localization and a weak GATA-1 expression.

To confirm the hypothesis mentioned above, we next analysed Hsp70 localization in MDS cells. We next assessed Hsp70 cellular localization and GATA-1 protein level in erythroblasts from low grade MDS patients visualized by fluorescence microscopy and immunodetection analysis. Our results indicated that while control cells exhibit Hsp70 nuclear relocalization and the presence of GATA-1 at day 10 corresponding to day 6 of normal erythroid culture when c-Kit decrease, no significative Hsp70 nuclear accumulation and the absence of GATA-1 in the nucleus (figure 4A, B, C). These data argue for a possible involvement of c-Kit in regulating Hsp70 cellular localization and subsequent GATA-1 protection.

Lentiviral expression of nuclear Hsp70 S400A rescued GATA-1 expression and MDS features.

To definitely confirm the key role of the modulation of Hsp70 phosphorylation status along the erythroid differentiation process, we overexpressed the Hsp70 WT or Hsp70 S400A proteins in MDS and control cell via lentiviral infection. We first, confirmed Hsp70 WT or Hsp70 S400A overexpression in these cells compared to the empty vector (data not shown). Next, we showed by Western blot and fluorescence microscopy analysis that, at day 14 of MDS cell culture, Hsp70 S400A overexpression promotes GATA-1 nuclear accumulation compared to control cells or Hsp70 WT expressing cells (figure 5A and 5B). Finally, to prove that GATA-1 rescue is really effective in Hsp70 S400A expressing cells, we analysed their mortality and erythroid differentiation capacity. As expected, Hsp70 S400A rescued MDS erythroblasts from death while empty vector or Hsp70 WT did not (trypan blue positive cells 4% , 9,3% and 8,3% respectively) (figure 5C). In addition, MGG staining revealed that Hsp70 S400A expression in MDS erythroid cells induced an increase of erythroid differentiation compared to empty vector or Hsp70 WT infected cells (differentiated cells 58% , 35% and 37% respectively) leading to a rescue of erythroid differentiation of MDS blasts (figure 5D). Thus, Hsp70 localization deregulation has direct consequences on the normal erythroid differentiation process and could explain why MDS patients exhibit arrest of erythroid differentiation and increased apoptosis at the stage of basophilic erythroblast.

Discussion:

It has previously been showed that the SCF receptor c-Kit is highly expressed on the cell surface from BFU-E to CFU-E and continues until the basophilic erythroblasts stage but decreasing gradually ⁶. Actually, it has been shown that SCF markedly stimulates the accumulation of erythroid progenitors cells in vitro and delays their differentiation while simultaneously providing enhanced proliferation by a process apparently independent of an effect on cell viability or programmed cell death ⁷. These observations suggest that c-Kit down modulation is indispensable for the process of terminal differentiation. However the mechanism involved while c-Kit is downregulated during erythropoiesis is still unknown. Here, we show that the level of c-Kit expression tightly regulates Hsp 70 cellular localization along the erythroid differentiation process according to a precise timing, allowing ultimately GATA-1 protection from caspase-3-mediated cleavage. More precisely, during the initial step

of erythropoiesis, c-Kit is highly expressed and activates the PI-3K/AKT pathway leading to the phosphorylation of Hsp70 on the S400 residue, located in its NES. This has the effect to promote the nuclear export of Hsp70 from the nucleus to the cytoplasm. Our data fit well the literature since several putative AKT targets like the forkhead transcription factors²⁶ the nuclear receptors RAR alpha (retinoic acid receptor alpha)²⁷ and Acinus, a nuclear factor required for apoptotic chromatin condensation²⁸, reside into the nucleus. In addition, a proteomic screen identified Hsp70 as target of AKT phosphorylation in mesangial cells²⁴. Latter during the differentiation process, at the stage of pro-erythroblasts, c-Kit expression diminishes leading to a decrease of PI-3K/AKT activation and Hsp70 S400 phosphorylation. This phenomenon results in an inhibition of Hsp70 nuclear export and Hsp70 nuclear accumulation. In this context, Hsp70 can protect the transcription factor GATA-1 from cleavage at the onset of caspase-3 activation. Then, GATA-1 can promote the expression of anti-apoptotic and pro-differentiation genes allowing the completion of the process and production of mature erythrocytes. Our results are confirmed by a recent study based on MDS showing that expression of a caspase-3 resistant mutant of GATA-1 rescued MDS patients cells from maturation blockage and apoptosis and confirming the importance of GATA-1 protection for completion of erythropoiesis (manuscript in preparation).

We speculate here that, as a consequence of the absence of c-Kit downregulation, Hsp70 localization is deregulated in low grade MDS cells, leading to GATA-1 level reduction. This phenomenon can explain by itself the cellular phenotype associated with MDS since overexpression of the Hsp70 S400A mutant in MDS cells is sufficient to recover normal erythropoiesis.

In conclusion, Hsp70 chaperone activity on GATA-1 is tightly regulated through AKT-mediated phosphorylation on the S400 residue according to a precise timing determined by the c-Kit expression level. It clearly appears from this work that Hsp70 trafficking regulation is a new pivotal role in erythroid differentiation program and that this regulation is impaired in several pathological contexts like MDS.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the “ANR” and “INCa”. CG leads team “Labellisées” from the “Ligue Nationale contre le Cancer”. AdT is recipient of a post-doctoral fellowship from ARC (association pour la recherche sur le cancer), SS has a post-doctoral fellowship from the “Conseil Regional de Bourgogne”, JV is recipient of a doctoral fellowship from the “ARC”.

AuthorShip

JV and EF designed experiments, performed research and analyzed data. A.S.G, G.C., F.V., S.C., J.K., J.A.R, C.G., P.M. performed research and analyzed data. Adt provided mutant Hsp70 Plasmid constructs. M.F. and O.H. directed the work, supervised the research and wrote the paper with J.V.

Bibliography

1. Russell, E. S. Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv Genet* 20, 357-459 (1979).
2. 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).
3. Lin, C. S., Lim, S. K., D'Agati, V. & Costantini, F. Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev* 10, 154-64 (1996).
4. Emerson, S. G. et al. Purification of fetal hematopoietic progenitors and demonstration of recombinant multipotential colony-stimulating activity. *J Clin Invest* 76, 1286-90 (1985).
5. Iscove, N. N., Sieber, F. & Winterhalter, K. H. Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow: analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-concanavalin A. *J Cell Physiol* 83, 309-20 (1974).
6. Uoshima, N. et al. Changes in c-Kit expression and effects of SCF during differentiation of human erythroid progenitor cells. *Br J Haematol* 91, 30-6 (1995).
7. Muta, K., Krantz, S. B., Bondurant, M. C. & Dai, C. H. Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation. *Blood* 86, 572-80 (1995).
8. 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, 11686-95 (2003).
9. Huddleston, H. et al. Functional p85alpha gene is required for normal murine fetal erythropoiesis. *Blood* 102, 142-5 (2003).
10. Hong, L., Munugalavadla, V. & Kapur, R. c-Kit-mediated overlapping and unique functional and biochemical outcomes via diverse signaling pathways. *Mol Cell Biol* 24, 1401-10 (2004).
11. Sawada, K. et al. Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *J Cell Physiol* 142, 219-30 (1990).
12. Witthuhn, B. A. et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 74, 227-36 (1993).
13. Klingmuller, U. The role of tyrosine phosphorylation in proliferation and maturation of erythroid progenitor cells--signals emanating from the erythropoietin receptor. *Eur J Biochem* 249, 637-47 (1997).
14. Wojchowski, D. M., Gregory, R. C., Miller, C. P., Pandit, A. K. & Pircher, T. J. Signal transduction in the erythropoietin receptor system. *Exp Cell Res* 253, 143-56 (1999).
15. Tilbrook, P. A., Ingle, E., Williams, J. H., Hibbs, M. L. & Klinken, S. P. Lyn tyrosine kinase is essential for erythropoietin-induced differentiation of J2E erythroid cells. *Embo J* 16, 1610-9 (1997).
16. Tilbrook, P. A. et al. Maturation of erythroid cells and erythroleukemia development are affected by the kinase activity of Lyn. *Cancer Res* 61, 2453-8 (2001).

17. Chin, H. et al. Lyn physically associates with the erythropoietin receptor and may play a role in activation of the Stat5 pathway. *Blood* 91, 3734-45 (1998).
18. Socolovsky, M., Fallon, A. E., Wang, S., Brugnara, C. & Lodish, H. F. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* 98, 181-91 (1999).
19. Zermati, Y. et al. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* 193, 247-54 (2001).
20. Ribeil, J. A. et al. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 445, 102-5 (2007).
21. Harris, N. L. et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol* 10, 1419-32 (1999).
22. Raza, A. et al. Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 86, 268-76 (1995).
23. Shimizu, R. et al. Leukemogenesis caused by incapacitated GATA-1 function. *Mol Cell Biol* 24, 10814-25 (2004).
24. Barati, M. T., Rane, M. J., Klein, J. B. & McLeish, K. R. A proteomic screen identified stress-induced chaperone proteins as targets of Akt phosphorylation in mesangial cells. *J Proteome Res* 5, 1636-46 (2006).
25. Tsukahara, F. & Maru, Y. Identification of novel nuclear export and nuclear localization-related signals in human heat shock cognate protein 70. *J Biol Chem* 279, 8867-72 (2004).
26. Kops, G. J. & Burgering, B. M. Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling. *J Mol Med* 77, 656-65 (1999).
27. Srinivas, H. et al. Akt phosphorylates and suppresses the transactivation of retinoic acid receptor alpha. *Biochem J* 395, 653-62 (2006).
28. Hu, Y. et al. Akt phosphorylates acinus and inhibits its proteolytic cleavage, preventing chromatin condensation. *Embo J* 24, 3543-54 (2005).

Figure legends

Figure 1: Decreased c-Kit expression, and subsequent activated AKT, induced Hsp70 nuclear localization

Human primary erythroblasts were induced to differentiate with Epo, IL-3 and SCF. At the days indicated (day 3, 6, 8 and day 10) (A) nuclear and cytoplasmic fraction or (B) total cell lysate were resolved on a gel and blotted with the indicated antibodies. (A, right panel) Nuclear Hsp70 during differentiation was quantified by densitometric analysis as the ratio of nuclear Hsp70 versus cytoplasmic Hsp70 at day 3, 6, 8 and day 10 (C) day 4 human primary erythroblasts cultured with Epo, IL-3 and SCF were 18 hours SCF starved or not and treated with 25 μ M LY294002 or not. Nuclear protein expression were analysed by immunoblot with the indicated antibodies. One representative out of three experiments is shown.

Figure 2: AKT induced Hsp70 phosphorylation in normal erythroblasts

(A) Schematic Hsp70. (B) Total cell lysate from 48h transfected 293T co-transfected with AKT* or not and HA tagged-Hsp70 WT or S400A or S275A were HA-immunoprecipitated

and proteins were resolved on a gel and blotted with the indicated antibodies. (B, right panel) ratio of phosphorylated/total Hsp70 was quantified by densitometric analysis. (n=4) (C) IP lysate from day 6 human primary erythroblasts cultured with Epo, IL-3 and SCF were immunoprecipitated using mouse Hsp70 or mouse Ig ctrl and proteins were resolved on a gel and blotted with the indicated antibodies.

Figure 3: AKT induced Hsp70 nuclear export through phosphorylation in NES

Day 6 human primary erythroblasts cultured with Epo, IL-3 and SCF were transfected with 5 μ g of HA tagged-Hsp70 WT or S400A or S400D. 48h later, Hsp70 localization were detected by fluorescence microscopy using anti-HA antibody. (A, lower panel) ratio of nuclear/cytoplasmic Hsp70 was quantified by densitometric analysis. (n=4)

Figure 4: defect of Hsp70 nuclear localization and GATA-1 expression in MDS

Human primary erythroblasts from low grade MDS (n=5) were induced to differentiate with Epo, IGF-1, SCF and dexamethasone. At the days indicated (day 7, 10 and day 14) (A) nuclear dapi and Hsp70 localization were detected by fluorescence microscopy and maturation were evaluated by MGG coloration (B) nuclear fraction lysate were resolved on a gel and blotted with the indicated antibodies. (C) Hsp70 localization and GATA-1 content were detected by fluorescence microscopy and maturation were evaluated by MGG coloration.

Figure 5: Lentiviral S400A Hsp70 expression in MDS rescued GATA-1 cleavage and phenotype

Day 14 human primary erythroblasts from low grade MDS (n=3) were induced to differentiate with Epo, IGF-1, SCF and dexamethasone and transduced three times with an empty lentivirus construct (white column) or one encoding Hsp70WT (thick lined column) or one encoding Hsp70 S400A (lined column). (A) day 14 total cell lysate were resolved on a gel and blotted with the indicated antibodies. (A, lower panel) GATA-1 content was quantified by densitometric analysis as the ratio of GATA-1 versus Hsc70. (B) Hsp70 localization and GATA-1 content were detected by fluorescence microscopy. At day 14 (C) the percentage of dead cells was evaluated by trypan blue positive cells (D) and maturation were evaluated by count of polychromatophilic erythroblasts

Figure 1: Decreased c-Kit expression, and subsequent activated AKT, induced Hsp70 nuclear localization

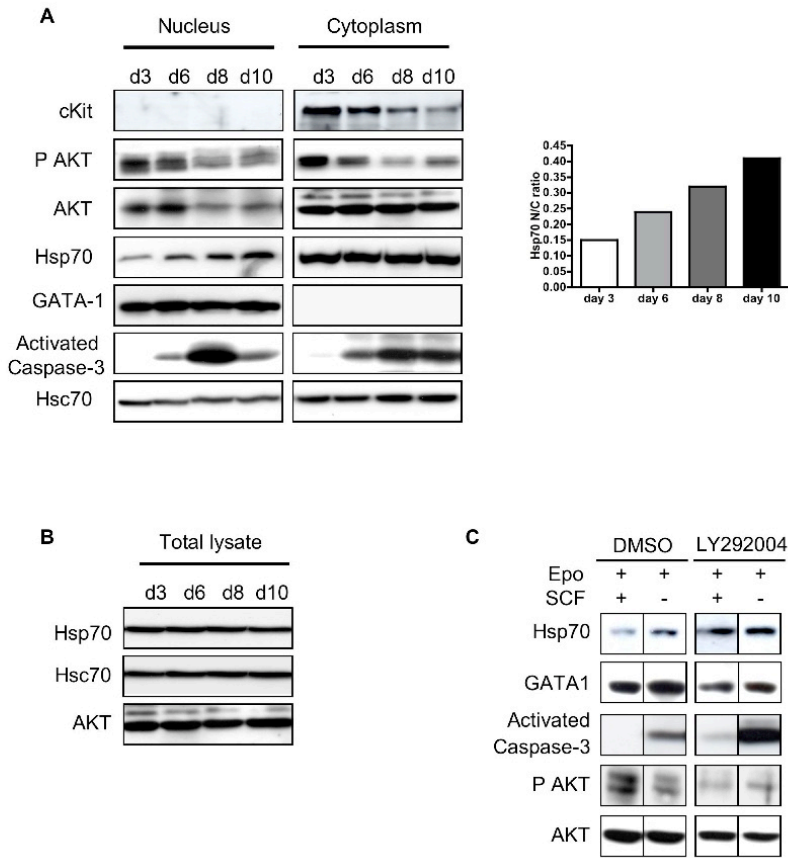


Figure 2: AKT induced Hsp70 phosphorylation

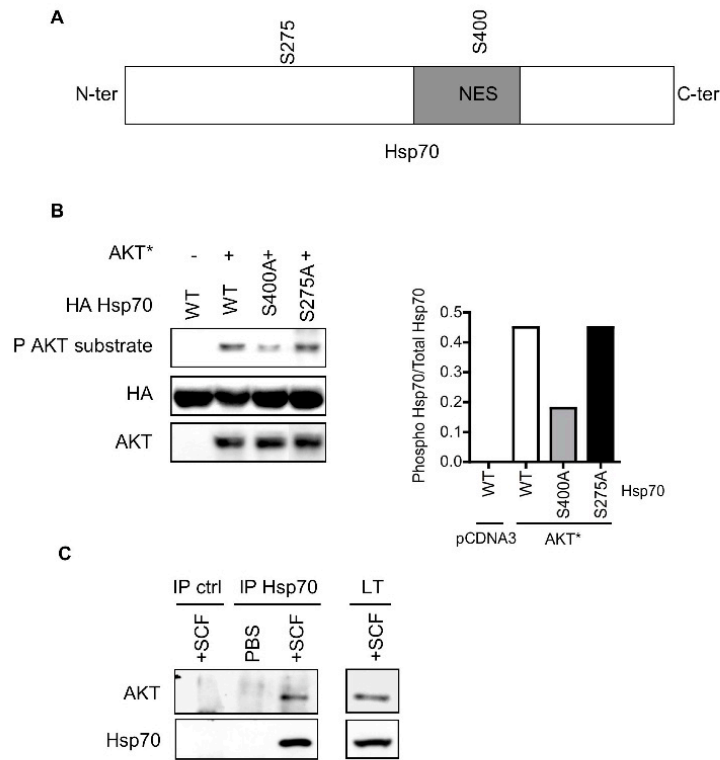


Figure 3: AKT induced Hsp70 nuclear export through phosphorylation in NES

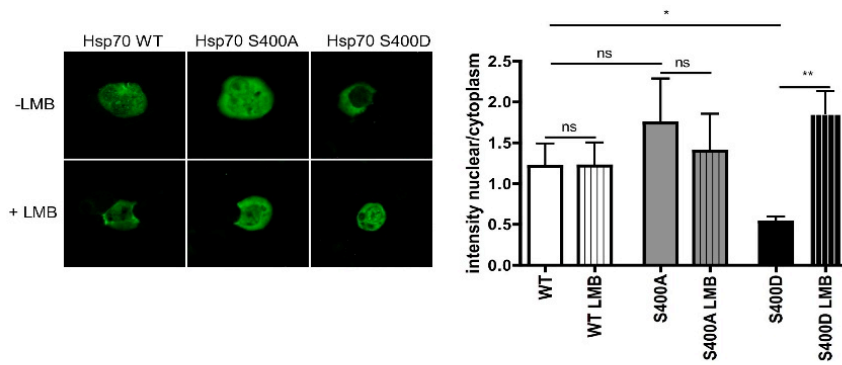


Figure 4: c-Kit overexpression induced a defect of Hsp70 nuclear localization in MDS

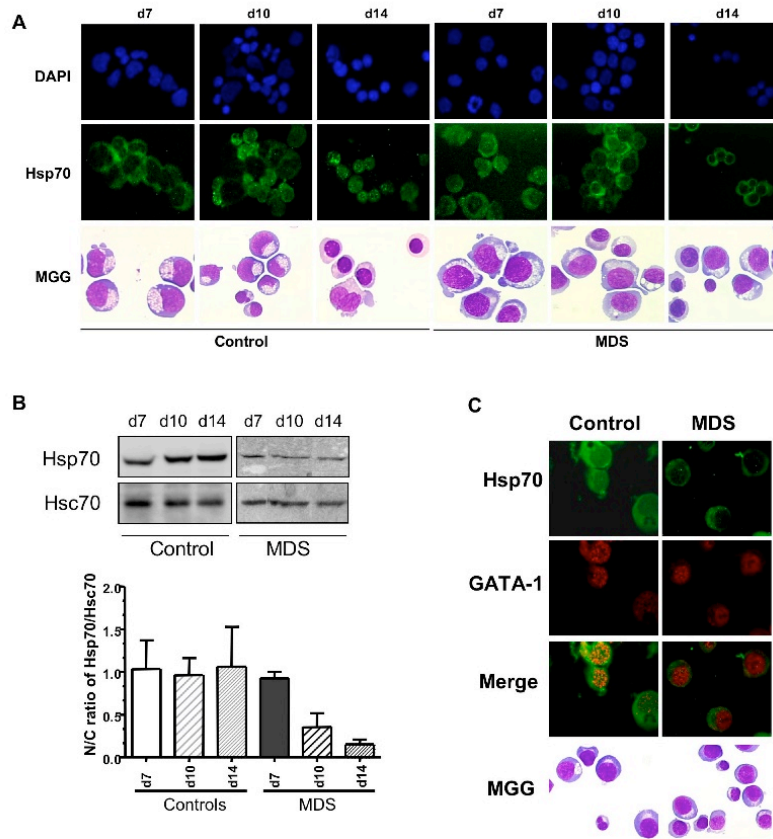
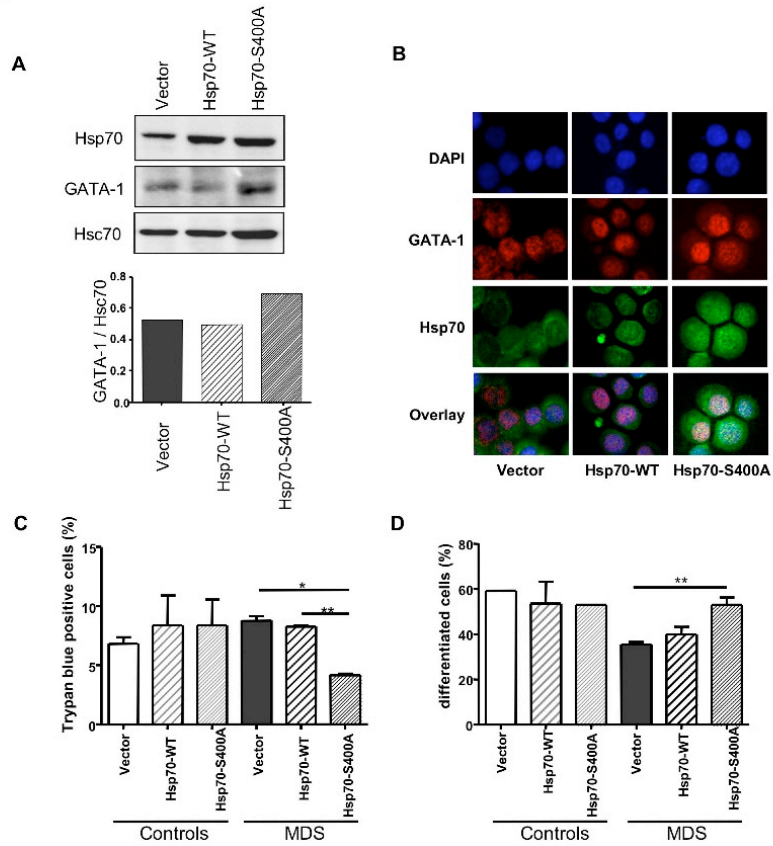


Figure 5: lentiviral S400A Hsp70 expression in MDS rescued GATA-1 cleavage and phenotype



2.3 Conclusions article 2

Dans la première partie de ma thèse, nous avons établi un modèle physiologique dans lequel la localisation d'Hsp70 joue un rôle majeur pour la survie et la différenciation des érythroblastes normaux en protégeant GATA-1 du clivage par la caspase-3.

Dans cette partie du travail, nous avons mis en évidence un rôle de c-Kit sur la localisation subcellulaire d'Hsp70. En effet, au stade CFU-E, avant l'activation de la caspase-3, l'expression de c-Kit est élevée et Hsp70 est majoritairement cytoplasmique. A partir du stade d'érythroblaste basophile, lors de l'activation de la caspase-3, l'expression de c-Kit diminue et la voie PI3-K/AKT est également réduite. Ceci entraîne l'accumulation nucléaire d'Hsp70. Afin de confirmer le rôle de c-Kit et la voie PI3-K/AKT sur la localisation d'Hsp70, nous avons montré que la privation en SCF ou le blocage de la voie PI3-K par un inhibiteur chimique avant l'activation de la caspase-3 entraînent l'accumulation nucléaire d'Hsp70 de manière similaire à l'effet de la diminution de c-Kit observée au cours de la différenciation érythroïde terminale. Afin de confirmer ce modèle, il nous reste à tester si la surexpression lentivirale de c-Kit dans des érythroblastes normaux entraîne un blocage de l'accumulation nucléaire d'Hsp70.

Dans un second temps, nous avons montré le mécanisme par lequel l'activation de la voie PI3-K/AKT suite à la fixation du SCF sur c-Kit pouvait moduler la localisation subcellulaire d'Hsp70. Nous avons montré qu'en interagissant directement avec Hsp70, AKT induit sa phosphorylation sur le résidu S400 situé dans la NES. Précédemment, une étude protéomique à partir de cellules mésangiales a identifié Hsp70 comme un substrat de phosphorylation par AKT³³⁰. La phosphorylation de ce résidu sérine 400 entraîne l'export nucléaire de la chaperonne, puisque le traitement d'érythroblastes primaires par la Leptomycin B (LMB), un inhibiteur de l'export nucléaire, induit la rétention nucléaire d'un mutant d'Hsp70 pseudophosphorylé sur la S400. Ce résultat indique qu'Hsp70 est exportée activement du noyau vers le cytoplasme. De même, il a été décrit précédemment qu'une mutation dans la NES d'Hsc54 ou suite au traitement par la LMB, la protéine s'accumule dans le noyau de COS7³³¹. Donc, au cours de la différenciation érythroïde terminale, la diminution de l'activation de la voie PI3-K/AKT consécutive à la diminution d'expression de c-Kit, induit une diminution de l'export nucléaire d'Hsp70 permettant à la chaperonne de s'accumuler dans le noyau des érythroblastes au moment de l'activation de la caspase-3.

En collaboration avec l'équipe du Pr M. Fontenay, nous avons pu montrer, que dans les SMD de bas grade, un défaut de localisation nucléaire d'Hsp70 explique la diminution

d'expression de GATA-1 observée, ce qui induit à l'arrêt de différenciation ainsi que l'apoptose des progéniteurs de patients au moment où la caspase-3 est activée. Nous avons également mis en évidence que la surexpression d'un mutant d'Hsp70 pour la S400, ne pouvant être phosphorylé par AKT et qui induit la localisation nucléaire de la protéine, restaure partiellement la survie et la différenciation des érythroblastes de patients atteints de SMD. Des études montrent que l'expression de c-Kit³³² ainsi que la phosphorylation d'AKT³³³ sont augmentées chez certains patients atteints de SMD. Il nous reste à montrer que l'expression prolongée de c-Kit après le stade d'érythroblaste basophile entraîne une diminution de la localisation nucléaire d'Hsp70 chez les patients atteints de SMD de bas grade.

3 Rôle de la tyrosine kinase Lyn sur la localisation subcellulaire d'Hsp70 au cours de la différenciation érythroïde terminale

3.1 Contexte scientifique et situation du projet

Le SCF et l'Epo sont les deux cytokines principales nécessaires à la production des globules rouges. L'Epo n'est pas nécessaire au stade précoce de l'érythropoïèse, incluant le stade BFU-E et l'administration *in vivo* d'Epo a peu d'influence sur le nombre de BFU-Es. Par contre, l'administration d'Epo augmente fortement le nombre de CFU-Es et de précurseurs érythroïdes jusqu'au stade d'érythroblastes basophiles, principalement en évitant leur apoptose et à un moindre degré en augmentant leur prolifération. L'Epo est donc le régulateur majeur de la production de globules rouges et délivre les signaux essentiels de croissance, survie et différenciation aux progéniteurs et précurseurs érythroïdes.

L'Epo exerce son effet en stimulant le REpo. Le REpo existe à l'état dimérique lorsqu'il n'est pas lié à son ligand. Lors de la fixation de l'Epo, le récepteur subit un changement conformationnel qui permet la transphosphorylation et l'activation de la voie JAK/STAT, ras/Raf/Erk, PI3K/AKT et la tyrosine kinase Lyn membre de la famille des Src^{114,156,334,335,125,154,336}. En effet, après la phosphorylation du REpo par JAK2, Lyn se fixe sur le récepteur et phosphoryle des protéines de la signalisation intracellulaire telles que STAT5, Crkl, Plc et Erk ainsi que le REpo lui-même^{154,336,146,337}.

La lignée érythroleucémique J2E, immortalisée au stade de proérythroblaste/érythroblaste basophile, a été utilisée pour décrypter le rôle de Lyn dans la signalisation de l'Epo. Les cellules de cette lignée J2E différencient sous Epo. Un sous-clone de la lignée J2E,

les cellules J2E-NR sont déficientes pour Lyn et montrent un défaut de différenciation en réponse à l'Epo ¹⁴⁶. La surexpression de Lyn dans cette lignée restaure le défaut de différenciation et à l'inverse, l'expression d'un dominant négatif de Lyn dans la lignée parentale J2E inhibe la différenciation érythroïde induite par l'Epo ^{146,337}. Le rôle majeur de Lyn sur la différenciation érythroïde a été démontré sur des érythroblastes primaires humains, où l'inactivation sélective de Lyn inhibe la différenciation érythroïde au stade d'érythroblaste basophile ¹⁵³. L'effet de l'inhibition de Lyn sur la différenciation érythroïde passe probablement par GATA-1. En effet, les érythroblastes de souris déficientes pour Lyn n'expriment pas GATA-1 et EKLF, l'expression de STAT5a/b est diminuée et une anomalie de différenciation terminale est observée, ainsi qu'une augmentation du nombre de BFU-Es et CFU-Es dans la rate associée à une anémie ¹⁴⁷. Une autre étude réalisée sur des érythroblastes issus de souris Lyn ^{-/-} confirme un rôle de Lyn dans la différenciation puisque les érythroblastes matures (Ter119^{pos}) de ces souris sont diminués et l'expression de Bcl-X_L est également inhibée ¹⁴⁸.

Dans le laboratoire, nous avons démontré que la protéine Hsp70 est localisée dans le cytoplasme et le noyau où elle colocalise avec GATA-1, au cours de la différenciation érythroblastique. Au cours de l'apoptose induite par la déprivation en Epo, Hsp70 est délocalisée du noyau vers le cytoplasme permettant ainsi le clivage de GATA-1 par la caspase-3 activée. Nous proposons ainsi un modèle dans lequel, l'Epo détermine le destin des érythroblastes (apoptose versus différenciation) en aval de la caspase-3 en régulant la localisation d'Hsp70 (cytoplasmique versus nucléaire et cytoplasmique) ³²⁹.

Etant donné que l'inhibition de Lyn dans les progéniteurs érythroïdes induit un arrêt de différenciation au stade d'érythroblaste basophile également observé lors de l'inhibition d'expression d'Hsp70, nous avons cherché à évaluer le rôle de Lyn sur la localisation d'Hsp70 dans les progéniteurs érythroïdes primaires en présence d'Epo.

3.2 Matériels et Méthodes

Isolément et culture de progéniteurs érythroïdes

Après avoir isolé les cellules mononucléées par gradient de Ficoll (Amersham Bioscience) à partir de sang de cordon, les progéniteurs hématopoïétiques CD34 positifs ont été triés par sélection positive à l'aide d'anticorps anti-CD34 et de colonnes magnétiques Midi-MACS (Isolation de CD34, Miltenyi). Les cellules sont ensuite cultivées dans un milieu

sans sérum IMDM BIT 15%, 1% PS, 1% glutamine en présence de SCF (100ng/ml), IL3 (10 ng/ml), IL6 (100 ng/ml) pendant 7 jours puis, les cellules CD36+ sont isolées à l'aide de l'anticorps anti-CD36 et de colonnes magnétiques Midi-MACS (Miltenyi) et cultivées en IMDM BIT 15%, 1% PS, 1% glutamine en présence de SCF (100ng/ml), IL3 (10 ng/ml), Epo (2 U/ml).

Transfection de progéniteurs CD34+

L'ARN interférence (siRNA) de Lyn a été conçu par Dharmacon. Le siRNA contrôle a également été fourni par Dharmacon.

2.10⁶ cellules CD34 cultivées 5 jours en présence de SCF (100ng/ml), IL3 (10 ng/ml), IL6 (100 ng/ml) ont été transfectées avec le kit de nucléofection Amaxa selon les instructions du fabricant soit avec 1,87 µg de siRNA contre Lyn ou contrôle puis, remises en suspension et cultivées en présence de SCF (100ng/ml), IL3 (10 ng/ml), IL6 (100 ng/ml). Le lendemain, les cellules sont lavées avec du milieu à 37°C et remises en suspension à une concentration finale de 5.10⁵ cellules/ml en IMDM BIT 15%, 1% PS, 1% glutamine en présence d'IL3 (10 ng/ml), Epo (2 U/ml).

Western Blotting

Les progéniteurs érythroïdes sont lavés deux fois en PBS additonné de 1 mM de Na₃VO₄ avant d'être lysées dans un tampon laemmli à 95°C (62,5 mM Tris HCl pH 6,8, 1% SDS, 1,15% Glycérol, additionné de bleu de bromophénol). D'autre part, afin de séparer les protéines cytoplasmiques et nucléaires, après deux lavages en PBS additonné de 1 mM de Na₃VO₄, les cellules sont lysées dans un tampon (20 mM Hepes, 10 mM KCl, 1mM EDTA, 10% glycerol) additionné d'agents détergents (0.2% NP40), d'inhibiteurs de protéases (1mM pmsf, 1 mM Na₃VO₄, 20 µg/ml aprotinine, 20 µg/ml leupeptine, 10 µg/ml pepstatine). Après récupération des protéines cytoplasmiques, le culot contenant les protéines nucléaires est lysé dans un tampon (20 mM Hepes, 10 mM KCl, 1mM EDTA, 350mM NaCl, 20% glycerol) additionné d'inhibiteurs de protéases. La quantité de protéines est mesurée par méthode colorimétrique (micro BCA protein assay, Pierce, EU) et, après addition de 5% (v/v) de mercaptoéthanol, 50 µg de protéines par condition sont déposées sur un gel de polyacrylamide concentré à 12%. Les protéines, séparées par leur poids moléculaire, sont ensuite transférées sur une membrane en PVDF (GE Healthcare, EU)). Une fois la membrane séchée puis réhydratée dans de l'éthanol 100% et bloquée par 4% de BSA afin d'éviter les fixations aspécifiques, la présence des protéines d'intérêt est détectée par des anticorps anti-Hsp70, anti-Hsc70 (Tebu, France), anti-Lyn, anti-GATA-1 (santa Cruz, France), anti-HA

(Covance), anti-PY102 (Cell signalling) suivis d'un anticorps secondaire conjugué à l'HRP (Pierce, EU). Le couplage est visualisé par chimiluminescence avec le kit ECL (Pierce).

Immunoprécipitation

80 10^6 CD36 cultivées pendant 8 jours en IMDM BIT 15%, 1% PS, 1% glutamine en présence de SCF (100ng/ml), IL3 (10 ng/ml), Epo (2 U/ml) sont lysées dans le tampon d'immunoprécipitation (tampon d'IP) (20 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,2% NP40, inhibiteurs de protéases Roche) additionné de 1mM Na_3VO_4 et 10mM NaF pendant 30 minutes sur glace puis, centrifugées à 13000rpm, 10 minutes à 4°C. 700 μg de protéines sont incubées avec les anticorps anti-Hsp70 de souris ou l'Ig contrôle pendant 1h à 4°C sous agitation. Ensuite, le complexe est précipité avec 20 μl de protéine A/G sur billes de sépharose (Amersham) pendant 1 h à 4°C sous agitation et les billes sont lavées 4 fois dans le tampon d'IP puis, resuspendues dans le laemmli buffer avant le dépôt sur gel de polyacrylamide de 12%.

Génération de mutants d'Hsp70

Les constructions des mutants d'Hsp70, Y524F, Y524D, Y15A and Y15D ont été réalisés par mutagenèse dirigée suivant les instructions du kit (Stratagen's QuickChange II site directed mutagenesis Kit, Agilent technology, Massy, France). Le plasmide pcdna3 Hsp70WT a été utilisé comme vecteur de départ pour l'annealing des oligonucléotides mutés suivants (synthétisés par Cogenics (Meylan, France):

Y524F reverse primer (5' GAGGCGGAGAAGTTCAAAGCGGAGGACGAG3') forward primer (5' CTCGTCCTCCGCTTTGAACTTCTCCGCCTC 3'); Y524D reverse primer (5' GAGGCGGAGAAGGACAAAGCGGAGGACGAG 3') forward primer (5' CTCGTCCTC CGCTTTGTCCTTCTCCGCCTC 3'); Y294D reverse primer (5' GTGATGGACGTGTCGAAGTCGAT G 3') forward primer (5' CATCGACTTCGACACGTCCATCAC 3'), Y294F reverse primer (5' CTGGTGATGGACGTGAAGAAGTCGAT G 3') forward primer (5' CATCGACTTCTTCACGTCCATCACCAG ').

Culture et transfection des 293T

La lignée cellulaire 293T est cultivée en DMEM, 1% PS, 1% glutamine en présence de 10% SVF (Hyclone) à une densité de $1 \cdot 10^5$ cellules/ml.

24h avant la transfection, $7 \cdot 10^5$ 293T en DMEM 10% SVF Glutamine sans antibiotiques (PS) sont plantées dans une plaque de 6 cm de diamètre. Le lendemain, les cellules à 50-70 % de confluence sont transfectées par 5 μg de plasmides à l'aide du kit

JetPEI Polyplus (Ozyme) selon les instructions du fabricant. Après 48h, les cellules sont lysées et les protéines taggées HA sont immunoprécipitées à l'aide du kit anti-HA microbeads (Myltneyi) puis déposées sur un gel de polyacrylamide concentré à 12%.

Marquage immunocytologique et analyse par microscopie confocale

5.10⁶ cellules ont été diluées dans du PBS 1X SVF 2% et centrifugées pendant 5 minutes à 300 rpm sur lames Superfrost. Celles-ci ont été conservées à -80°C. Pour l'immuno-marquage, les cellules ont été décongelées sur glace ; fixées à l'acétone ; hydratées pendant 30 minutes avec du tampon PBS 1X, BSA 1% ; perméabilisées en PBS 1X, formaldéhyde 2% pendant 20 minutes puis en PBS 1X, triton 0,2% pendant 5 minutes à 4°C. Les sites aspécifiques ont été bloqués avec de la BSA 10% pendant 30 minutes. Pour le marquage, les anticorps ont été dilués en PBS 1X, BSA 1%, Tween20 0,1% et les lavages ont été réalisés avec du PBS 1X, BSA 1%. Les cellules ont été incubées séquentiellement avec l'anticorps de lapin anti-Hsp70 (Santa Cruz) au 1/100^{ème} pendant 1 heure à température ambiante; l'anticorps anti-IgG de lapin couplé à cy5 (Jackson ImmunoResearch) au 1/20^{ème} pendant 1 heure à température ambiante ; l'iodure de propidium (BD) au 1/50^{ème}, pendant 5 minutes à température ambiante. Après 3 lavages , les cellules ont été mises sous lamelles avec du milieu de montage Fluoprep (Biomérieux). Les lames ont été analysées à l'aide d'un microscope confocale (LSM 510 Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

3.3 Résultats

L'inhibition de Lyn induit la délocalisation nucléaire d'Hsp70

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer la voie de signalisation activée par l'Epo qui est impliquée dans la localisation nucléaire d'Hsp70. Pour cela, dans des érythroblastes primaires cultivés en présence d'Epo, les voies de signalisation JAK2, PI3-K, Erk et Src ont été inhibées à l'aide des inhibiteurs chimiques AG490, LY294002, PD98059 et PP2 respectivement puis, la localisation subcellulaire d'Hsp70 a été déterminée par microscopie confocale. La privation en Epo ainsi que l'inhibition des voies JAK2 et Src induisent une diminution de la localisation nucléaire d'hsp70 alors que l'inhibition des voies PI3-K et Erk ne modifie pas la localisation subcellulaire de la chaperonne (figure 1A). JAK2 étant en amont de la cascade de signalisation et Lyn étant la Src kinase la plus exprimée au cours de l'érythropoïèse, nous avons approfondi l'étude de la voie Lyn. Par western blotting et microscopie confocale, on observe que l'inhibition de l'expression de Lyn par ARN

interférence dans des érythroblastes cultivés en présence d'Epo induit également la délocalisation nucléaire d'Hsp70 ainsi que la diminution d'expression de GATA-1 (figure 1B et C). Ces résultats suggèrent que la tyrosine kinase Lyn activée par l'Epo est indispensable à la localisation nucléaire d'Hsp70.

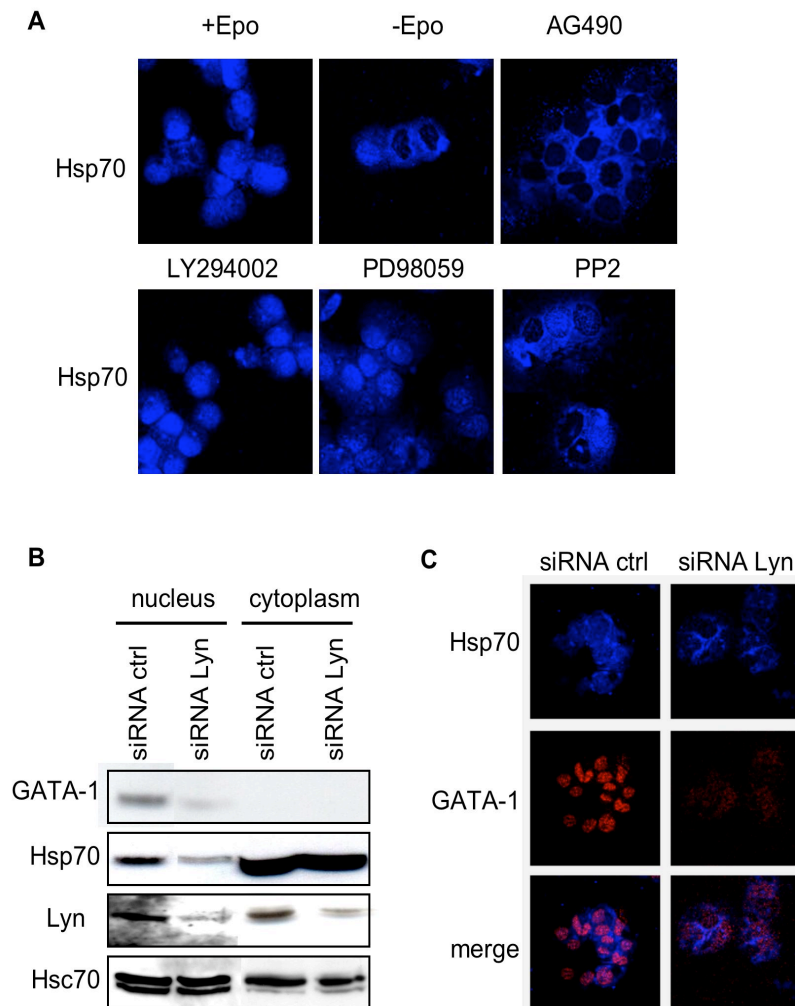


Figure 1 : L'inhibition de Lyn induit la délocalisation nucléaire d'Hsp70.

A) Des érythroblastes cultivés 5 jours en présence d'Epo, SCF, IL3 ont été incubés 6h en présence de AG490 (50 μ M), LY294002 (25 μ M), PD98059 (20 μ M), PP2 (10 μ M) ou en absence d'Epo, puis 1 10^5 cellules ont été cyto-centrifugées sur lame et marquées par l'anticorps anti-Hsp70 puis visualisées par un microscope confocal Zeiss.

2 10^6 cellules cultivées 5 jours en présence de SCF, IL3, IL6 ont été électroporées par le siRNA Lyn ou contrôle. 24h après la transfection, les cellules sont cultivées pendant 3 jours en présence d'Epo et IL3 puis **B)** les fractions cytoplasmiques et nucléaires sont déposées sur gel de polyacrylamide et les protéines sont détectées à l'aide des anticorps indiqués et **C)** l'analyse de la localisation d'Hsp70 et de l'expression de GATA-1 ont été réalisées par microscopie confocale.

L'Epo empêche l'export nucléaire d'Hsp70 par la voie Lyn

Afin de déterminer l'effet de l'Epo et de Lyn sur l'import ou l'export nucléaire d'Hsp70, nous avons utilisé la Leptomycin B (LMB), un inhibiteur de l'export nucléaire Crm-1 dépendant, et analysé son effet sur la localisation nucléaire d'Hsp70 en condition de privation en Epo ou pas ou en présence de l'inhibiteur des Src kinases SU6656 ou pas. Par western blotting, on observe qu'en condition de privation en Epo, la LMB prévient l'export nucléaire d'Hsp70 alors qu'en présence d'Epo, la LMB n'augmente pas la localisation nucléaire d'Hsp70 (figure 2 A). De plus, en présence d'Epo, l'inhibition de la voie Lyn par l'inhibiteur chimique SU6656 induit la diminution d'Hsp70 nucléaire. Celle-ci est rétablie par l'ajout de LMB (figure 2B). Ces résultats montrent que l'Epo, en activant la voie Lyn, permet la localisation nucléaire d'Hsp70 en empêchant son export nucléaire.

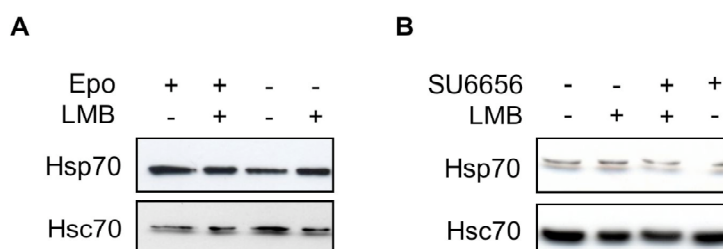


Figure 2 : L'Epo prévient l'export nucléaire d'Hsp70 par la voie Lyn.

Extraits nucléaires d'érythroblastes cultivés 7 jours sous Epo, SCF, IL3 et A) déprivés ou non en cytokines, en présence ou non de LMB (20nM) pendant 6h B) incubés ou non avec l'inhibiteur SU6656 à 5nM, en présence ou non de LMB (20nM) pendant 6h.

Lyn induit la phosphorylation sur tyrosine d'Hsp70

Lyn étant une tyrosine kinase, nous avons testé si elle était capable de phosphoryler directement Hsp70. Dans un premier temps, nous avons vérifié s'il existe une interaction physique directe entre les deux protéines. Pour cela, Hsp70 a été immunoprécipité à partir de lysat total d'érythroblastes et par wester-blotting, on observe que Lyn co-immunoprécipite avec Hsp70 dans les érythroblastes primaires en présence d'Epo et pas dans le contrôle (figure 3A). Dans les 293T, la construction plasmidique d'Hsp70 munie du tag HA a été co-transfectée avec le plasmide dominant négatif de Lyn (Lyn DN), Lyn Y397F, ou la forme activée, Lyn Y508F. Le résultat d'immunoprécipitation d'Hsp70 à l'aide du tag HA montre à nouveau que Lyn interagit directement avec Hsp70 (Figure 3C). Cependant, on observe que seule la forme de Lyn activé, Lyn Y508F, interagit avec Hsp70. De plus, à l'aide de l'anticorps anti PY102 qui détecte des phosphorylations sur résidus Y, on observe qu'Hsp70 WT est phosphorylée en présence de Lyn activé et pas en présence du Lyn DN (Figure 3C). Il semble donc que Lyn interagisse avec Hsp70 et induise sa phosphorylation.

Dans un second temps, nous avons donc recherché les tyrosines d'Hsp70 potentiellement ciblées par la kinase Lyn à l'aide du logiciel *Group-based Prediction System 2* (GPS2). Il apparaît que la tyrosine 524, déjà connue pour induire la localisation nucléaire d'Hsp70 sous sa forme phosphorylée lors d'un choc thermique³³⁸ et la tyrosine 294 sont des cibles possible de Lyn. Afin de vérifier cette hypothèse, les tyrosines 524 et 294 d'Hsp70 ont été mutées. Les mutants d'Hsp70 ou Hsp70 WT ont été transfectés dans des 293T en présence de Lyn Y508F activé, puis le statut de phosphorylation d'Hsp70 a été déterminé par western blotting après immunoprécipitation par le tag HA des mutants d'Hsp70. La figure 3C montre que la mutation de la tyrosine 294 et pas celle de la tyrosine 524 diminue le statut de phosphorylation d'Hsp70 lorsque ce mutant est co-exprimé avec Lyn activé suggérant que la tyrosine 294 est une cible de la phosphorylation de Lyn. Ensemble, ces résultats indiquent que Lyn interagit avec Hsp70 pour la phosphoryler sur la tyrosine 294 ce qui bloque probablement son export nucléaire.

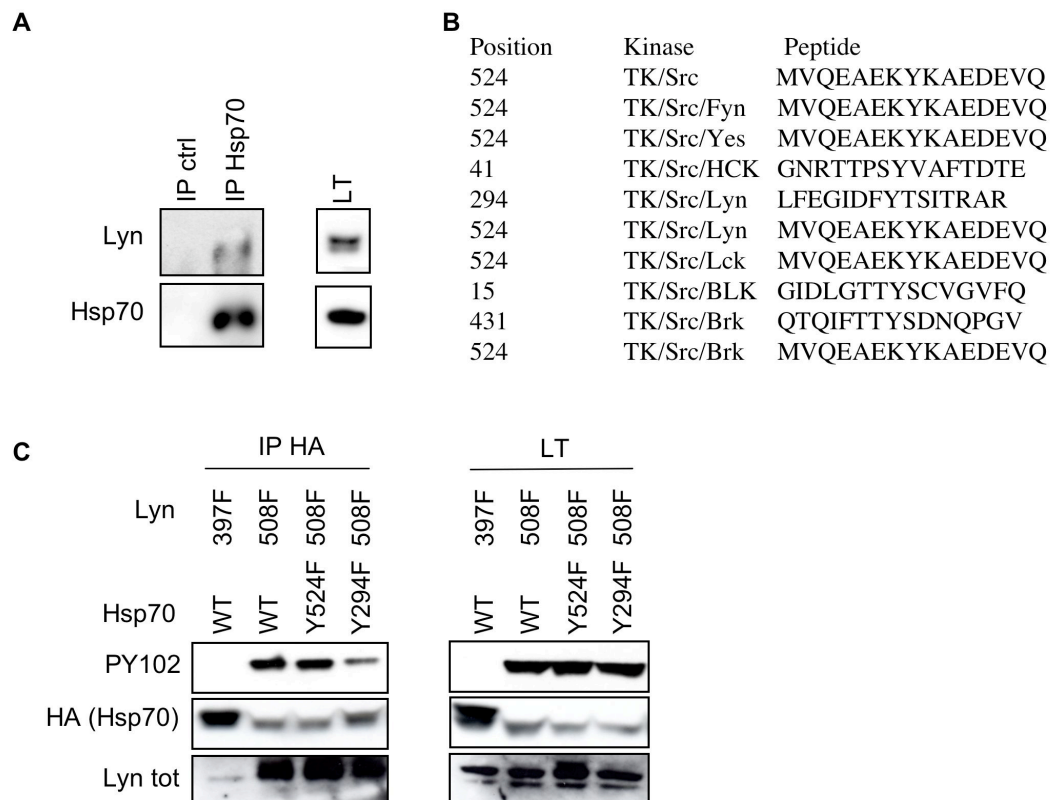


Figure 3 : Lyn interagit et phosphoryle Hsp70 sur la Y294.

A) Immunoprécipitation d'Hsp70 à partir de lysat total d'érythroblastes cultivés 8 jours en présence d'Epo, SCF, IL3 et analyse des protéines après migration du complexe immnun sur gel de polyacrylamide. **B)** Analyse sur la séquence d'Hsp70 des tyrosines potentiellement ciblées par la famille des Src kinase à l'aide du logiciel GPS2, avec un seuil de sensibilité moyen. **C)** Le plasmide Hsp70 muni du tag HA WT ou muté pour la Y524 ou la Y294 ont été co-transfectés avec Lyn Dominant négatif Y397F ou Lyn activé Y508F dans des 293T. Après immunoprécipitation du tag HA, le statut de phosphorylation sur tyrosines et la co-immunoprécipitation ont été analysés grâce aux anticorps indiqués.

Localisation subcellulaire de mutants d'Hsp70

Afin de confirmer le rôle de la phosphorylation des tyrosines 294 et 524 d'Hsp70 sur le blocage de l'export de la chaperonne, la localisation de plasmides d'expression d'Hsp70 WT ou muté pour la tyrosine 294 ou 524 munis du tag HA a été analysée par microscopie confocale dans des érythroblastes primaires cultivés en présence d'Epo. La mutation de la tyrosine (Y) en phénylalanine (F) bloque la phosphorylation et selon notre hypothèse, va induire l'export nucléaire d'Hsp70. A l'aide de l'anticorps anti-HA, les résultats indiquent qu'Hsp70 Y294F reste localisée dans le noyau de manière similaire à Hsp70 WT, en présence d'Epo sans LMB (moyenne de quantification de la fluorescence d'Hsp70 nucléaire par rapport à la fluorescence d'Hsp70 cytoplasmique de 1 et 1,3 respectivement) (figures 4A et B). Par contre, en présence d'Epo et sans LMB, la localisation nucléaire d'Hsp70 Y524F est diminuée de manière significative par rapport à Hsp70WT (moyenne de 0,4 et 1,3 respectivement) (figures 4A et B). En présence de LMB qu'il n'y a plus de diminution significative ni pour le mutant Y524F, ni pour le mutant Y294A par rapport à la forme WT (moyenne de 2,1 à 1,3 et de 1,1 à 1,3 respectivement) (Figures 4A et B). L'ensemble de ces résultats montre que le blocage de phosphorylation de la tyrosine 294 n'induit pas l'export nucléaire d'Hsp70 alors que la déphosphorylation de la tyrosine 524 entraîne l'export nucléaire d'Hsp70.

Il semble donc que le mécanisme d'action de Lyn sur Hsp70 n'implique pas directement sa phosphorylation mais il implique peut-être une phosphatase qui ciblerait la Y524. Il est possible que Lyn inhibe cette phosphatase, permettant ainsi la phosphorylation de la Y524 d'Hsp70 sous Epo.

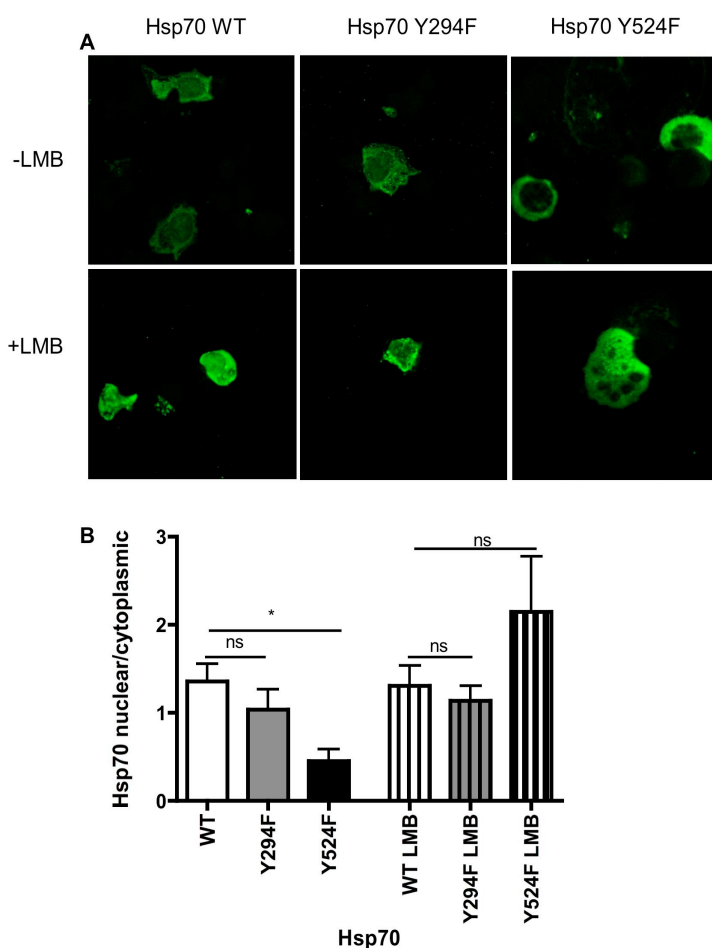


Figure 4 : la déphosphorylation de la tyrosine 524 et pas de la tyrosine 294 induit l'export nucléaire d'Hsp70.

A) Analyse par microscopie confocale de la localisation d'Hsp70 à l'aide de l'anticorps anti-HA dans des érythroblastes cultivés pendant 8 jours sous Epo, SCF, IL3 après 48h de transfection par 5 μ g de plasmide Hsp70 WT ou Hsp70 Y294F ou Hsp70 Y524F. **B)** Quantification de la fluorescence d'Hsp70 nucléaire par rapport à la fluorescence d'Hsp70 cytoplasmique.

Effet de Lyn sur la phosphatase SHP2.

Dans le but de tester l'hypothèse émise ci-dessus, nous avons pensé que SHP2 pouvait être un bon candidat en tant que phosphatase inhibée par Lyn. En effet, il existe une interaction entre Lyn et SHP2 dans les mastocytes ou dans une lignée dépendante de prolactine^{339,340}. D'autre part, une étude a montré qu'Hsp70 se lie à SHP2 dans une lignée dépendante de l'EGF³⁴¹. Nous avons donc testé l'interaction directe entre Lyn, SHP2 et Hsp70 dans des érythroblastes primaires. Pour cela, Lyn a été immunoprécipité à partir de lysat total et par western-blotting, on observe que SHP2 et Hsp70 co-immunoprécipitent avec

Lyn dans les érythroblastes primaires en présence d'Epo (figure 5A). Ensuite, nous avons testé l'effet de Lyn sur l'activation de la phosphatase. Lors de l'inhibition d'expression de Lyn par siRNA dans des érythroblastes primaires, on observe par western blotting que le statut de phosphorylation de la tyrosine 542 de SHP2 est augmenté, traduisant une augmentation de l'activité de la phosphatase (figure 5B).

Ces résultats montrent que Lyn interagit directement avec SHP2 pour inhiber son activité en présence d'Epo dans les érythroblastes. Il est donc probable que Lyn, en inhibant SHP2, permet la phosphorylation de la Y524 d'Hsp70 qui sera alors maintenue dans le noyau. Cependant, il reste encore à déterminer la kinase responsable de la phosphorylation de cette Y524.

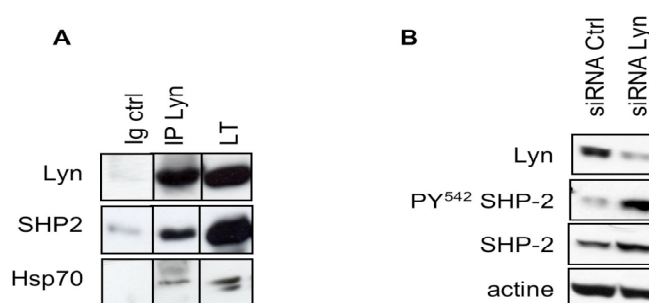


Figure 5 : Lyn interagit avec et inhibe la phosphatase SHP2 sous Epo.

A) Immunoprécipitation de Lyn à partir de lysat total d'érythroblastes cultivés 8 jours en présence d'Epo, SCF, IL3, déprivés pendant 6 h en cytokines et stimulés 5 minutes par 10u/ml d'Epo à 37°C puis analyse des protéines indiquées après migration du complexe immnun sur gel de polyacrylamide. B) 2 10⁶ cellules cultivées 5 jours en présence de SCF, IL3, IL6 ont été électroporées par le siRNA Lyn ou contrôle. 24h après la transfection, les cellules sont cultivées pendant 3 jours en présence d'Epo et IL3. Les lysats totaux de cellules déprivées pendant 6h et cytokines et stimulées pendant 5 minutes par 10u/ml d'Epo à 37°C sont déposées sur gel de polyacrylamide et les protéines sont détectées à l'aide des anticorps indiqués.

3.4 Conclusions résultats 3

Bien que le rôle de Lyn dans la différenciation érythroïde soit décrit, le mécanisme d'action de Lyn n'était pas encore établi. Dans cette étude, nous avons établi un modèle physiologique dans lequel Lyn joue un rôle majeur pour la survie et la différenciation des érythroblastes normaux en permettant la localisation nucléaire d'Hsp70. En effet, au cours de la différenciation érythroïde, l'Epo induit la localisation nucléaire d'Hsp70 qui protège GATA-1 du clivage de la caspase-3 activée transitoirement. Le modèle établi ici explique donc la diminution d'expression de GATA-1 observée dans les souris invalidées pour Lyn ¹⁴⁷

ainsi que la diminution d'expression de Bcl-X_L dans des érythroblastes de souris invalidées pour Lyn¹⁴⁸.

Il a été préalablement décrit que la localisation de Lyn est aussi nucléaire, cependant son rôle n'est pas clair³⁴². Une étude récente montre que LIAR (pour *Lyn interacting ankyrin repeat*), une nouvelle protéine permettant le transfert entre le cytoplasme et noyau de Lyn, influence la différenciation érythroïde³⁴³. En effet, l'expression de LIAR délété pour sa NLS entraîne un défaut de différenciation dans la lignée J2E sous Epo qui peut être lié à la diminution de Lyn dans le noyau. Nous suggérons ici que Lyn est impliqué indirectement dans la phosphorylation d'Hsp70 dans ce compartiment. De plus, une autre étude montre qu'au cours de l'apoptose, Lyn est clivé par la caspase-3 en N-terminal, générant une forme soluble de la protéine dont l'activité kinase est augmentée, permettant probablement ainsi la protection contre l'apoptose³⁴⁴. Il serait intéressant de vérifier si, au cours de l'activation de la caspase-3 observée lors de la différenciation érythroïde terminale, Lyn est clivé. Le produit de clivage de Lyn pourrait générer une forme active de Lyn et permettre la phosphorylation d'Hsp70 augmentant ainsi la localisation nucléaire d'Hsp70 qui protège GATA-1 du clivage par la caspase-3.

Nos résultats suggèrent que l'Epo, via Lyn, permet la localisation nucléaire d'Hsp70 en bloquant son export nucléaire. Il est donc probable qu'Hsp70 entre de manière passive dans le noyau. Il a été décrit qu'Hsp70 est cytosolique et nucléaire³⁴⁵³⁴⁶ et passe d'un compartiment à un autre³⁴⁷. Hsp70 possède une séquence de localisation nucléaire (NLS pour *nuclear related sequence*)³⁴⁸ capable de mener la *pyruvate kinase*, une protéine cytosolique, dans le noyau³⁴⁹. En effet, Hsp70 a été identifiée comme nécessaire pour l'import nucléaire, et son rôle dans le transport nucléaire a été montré par différentes études³¹⁷²⁵⁵³¹⁸³¹⁹. Ces études indiquent qu'Hsp70 agit pendant la phase d'attachement mais également lors de la phase de translocation de l'import nucléaire, probablement par son activité chaperonne en favorisant la formation et la stabilité du complexe Srp1p-NLS-substrat³²⁰. De cette manière, Hsp70 traverse la NE et entre dans le noyau comme facteur de transport en association avec le substrat NLS et Srp1p. Il a été montré qu'une mutation de NUP155, une nucléoporeine ou composant moléculaire critique pour l'assemblage et la fonction du NPC, est responsable de la fibrillation atriale. En effet, la perte de fonction de NUP155 entraîne une diminution de la perméabilité de la NE et une inhibition de l'import nucléaire d'Hsp70³²¹.

La délocalisation nucléaire d'Hsp70 a été observée lors de l'inhibition des Src kinases mais aussi de la kinase JAK2. Bien que Lyn se lie directement sur le REpo, Lyn n'est pas activée si un récepteur muté pour le site de liaison de JAK2 est exprimé dans la lignée J2E, ce

qui indique que JAK2 est la première kinase activée dans la signalisation de l'Epo et que Lyn est la kinase secondaire ³³⁷. L'inhibition de JAK2 entraîne donc l'inhibition successive de Lyn, ce qui explique la délocalisation d'Hsp70 lors de l'inhibition de JAK2. De plus, la tyrosine 524, est un motif potentiel de phosphorylation d'une kinase de la famille des kinases Tec qui comprend entre autres Btk (selon le logiciel GPS2 avec un seuil sensibilité élevé). Celle-ci est activée au cours de l'érythropoïèse dans un premier temps par Lyn en réponse au SCF puis par JAK2 en réponse à l'Epo ¹⁸⁶. Il n'est donc pas exclu que Btk soit directement impliqué dans la phosphorylation de la Y524 et la localisation nucléaire d'Hsp70. Cette hypothèse expliquerait l'effet de l'inhibition de Lyn et de JAK2 sur la localisation subcellulaire d'Hsp70.

Il est probable qu'une dérégulation de la localisation de cette protéine soit responsable d'une érythropoïèse pathologique notamment dans la polyglobulie de vaquez où une mutation de JAK2 dans le domaine pseudokinase entraîne la prolifération de colonies érythroïdes spontanées, une hypersensibilité à l'Epo et une différenciation érythroïde indépendante de l'Epo ³⁵⁰. La différenciation érythroïde indépendante d'Epo des érythroblastes de patients peut être diminuée par les inhibiteurs de JAK2 mais aussi des Src kinases ³⁵¹. D'autre part, au cours de l'érythroleucémie induite par le virus de Friend, les érythroblastes de souris déficientes pour Lyn ne développent pas de polyglobulie, suggérant un rôle de Lyn dans la phase tardive de la différenciation érythroïde terminale de la transformation ³⁵². De plus, l'expression constitutive de la kinase Src peut remplacer la signalisation du REpo ³⁵³. Il apparaît donc que la dérégulation des Src kinases et de Lyn, probablement liée à son effet sur la modulation de la localisation d'Hsp70, peut être responsable de pathologies érythroïdes et pourrait donc être envisagée comme alternative thérapeutique.

4 Rôle de la protéine de choc thermique Hsp27 au cours de la différenciation érythroïde terminale:

4.1 Contexte scientifique et situation du projet

Au cours de la différenciation érythroïde terminale, le niveau d'expression de GATA-1 semble un critère essentiel pour une maturation efficace, il être finement régulé. En effet, la diminution d'expression ou encore la surexpression de la protéine entraîne un arrêt de maturation et l'apoptose des progéniteurs érythroblastiques. GATA-1 permet la différenciation érythroïde terminale en induisant l'expression de gènes érythroïdes tels que le REpo, la globine ou encore Bcl-X_L. Cependant, la surexpression de GATA-1 peut mener à un phénotype tel que la létalité embryonnaire ⁴⁶. GATA-1 permet donc la différenciation érythroïde mais aussi l'arrêt du cycle nécessaire à la différenciation terminale ³¹. La protéine de choc thermique Hsp27 étant bien connue pour réguler la dégradation protéasomale de protéines, nous avons décidé d'étudier son rôle dans la régulation fine de GATA-1. Le rôle d'Hsp27 a été bien décrit dans diverses lignées tumorales mais très peu dans le système de différenciation érythroïde terminale.

Le rôle cytoprotecteur d'Hsp27 est lié à sa capacité d'inhiber les caspases mais aussi à sa capacité de promouvoir la dégradation protéasomale. Hsp27 joue un rôle primordial de survie et prolifération au niveau du protéasome en favorisant l'ubiquitinylation et la dégradation protéasomique de certains substrats protéiques tels que Iκ-Bα ²⁸⁷ ou encore p27^{Kip1} ²⁸⁸.

Les protéines emmenées vers puis dégradées par le protéasome sont ubiquitinées. En effet, les sous-unités du protéasome reconnaissent les chaînes d'ubiquitine. Il a été montré que la forme acétylée et ubiquitinée de GATA-1 est dégradée par le protéasome ⁶⁰.

Nous avons donc émis l'hypothèse qu'Hsp27 pourrait jouer un rôle dans la dégradation de GATA-1, dégradation indépendante des caspases et nécessaire à la différenciation érythroïde terminale.

4.2 Hsp27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation

Aurélie De Thonel*, **Julie Vandekerckhove** *, David lanneau, Subramania Selvakumar, Geneviève Courtois, Mathilde Brunet, Sébastien Maurel, Arlette Hammann, Jean-Antoine

Ribeil, Yael Zermati, Anne-Sophie Gabet, Joan Boyes, Eric Solary, Olivier Hermine, Carmen Garrido.

*premiers co-auteurs Blood, soumis

HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation

Aurelie De Thonel^{1,2}, Julie Vandekerckhove³, David Lanneau^{1,2}, Subramania Selvakumar^{1,2}, Geneviève Courtois³, Mathilde Brunet^{1,2}, Sebastien Maurel^{1,2}, Arlette Hammann^{1,2}, Jean Antoine Ribeil³, Yael Zermati³, Anne Sophie Gabet³, Joan Boyes⁵, Eric Solary^{1,2,6}, Olivier Hermine^{3,4}, Carmen Garrido^{1,2,6}

¹INSERM U866, ² Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Burgundy, Dijon 21000, France. ³ CNRS UMR 8147, ⁴ Department of Haematology, Faculty of Medicine, University of René Descartes Paris V, APHP, Necker, Paris 75270, France. ⁵ Institute of Molecular and Cellular Biology, University of Leeds, Leeds, UK. ⁶ CHU Dijon BP1542, Dijon, France.

°Both authors contributed equally to this work

Running title: HSP27 is essential for erythropoiesis

Corresponding author:

Carmen Garrido
INSERM U866
Faculty of Medicine & Pharmacy
7, boulevard Jeanne d'Arc
21033 Dijon, France
Phone : 33 3 80 39 32 84 , Fax : 33 3 80 39 34 34
email : cgarrido@u-bourgogne.fr

Abstract (151 words)

HSP27 is a chaperone whose cellular expression increases in response to various stresses and protects the cell by either inhibiting apoptotic cell death or promoting the ubiquitination and proteasomal degradation of specific proteins. Here, we show that GATA-1 is a client protein of HSP27. In two models of erythroid differentiation, i.e. in K562 cells induced to differentiate into erythroid cells upon hemin exposure and CD34-positive human cells *ex vivo* driven to erythroid differentiation in liquid culture, depletion of HSP27 provokes an accumulation of GATA-1 and impairs terminal maturation. More specifically, we demonstrate that, in the late stages of the erythroid differentiation program, HSP27 is phosphorylated in a p38-dependent manner, enters the nucleus, binds to GATA-1 and induces its ubiquitination and proteasomal degradation, provided that the transcription factor is acetylated. We conclude that HSP27 plays a role in the fine tuning of terminal erythroid differentiation through regulation of GATA-1 content and activity.

Introduction (4009 words)

Terminal erythroid differentiation is driven by the glycoprotein hormone erythropoietin (Epo) and involves the sequential formation of proerythroblasts and basophilic, polychromatic and orthochromatic erythroblasts in the bone marrow. This differentiation program is under control of the transcription factor GATA-1^{1,2}, which induces the expression of erythroid genes such as glycophorin A, erythropoietin (Epo) receptor and haemoglobin.³ GATA-1 also cooperates with Epo to promote erythroid precursor survival by positively regulating the *bcl-x_L* gene.^{3,4,5} Upon Epo starvation or engagement of the death receptor Fas (CD95/APO-1), caspases are activated and GATA-1 is cleaved. These events arrest erythroid precursor maturation and provoke cell death.^{6,7} Upon Epo stimulation of erythroid precursors, caspase-3 is also transiently activated and this activation is required for terminal erythroblast maturation, but GATA-1 remains uncleaved and erythroid cells do not die.^{8,9,10} We have demonstrated that, in Epo-stimulated erythroid precursors, GATA-1 was protected from caspase-3-mediated cleavage by the stress-inducible heat shock protein HSP70. At the onset of caspase-3 activation, HSP70 translocates from the cytoplasm to the nucleus and interacts with GATA-1. Epo deprivation disrupts the GATA-1/HSP70 interaction and exposes GATA-1 to the proteolytic effect of caspase-3.¹¹

Another stress-inducible HSP that is expressed in erythroid cells undergoing differentiation is HSP27.¹¹ This small stress protein has demonstrated pro-survival functions through interaction with proteins such as cytochrome c, caspase-3, Daxx and actin (for a review, see¹²). HSP27 is also an ATP-independent chaperone that binds ubiquitin, with a higher affinity for long chains of ubiquitin than for mono-ubiquitin, and orchestrates the degradation of proteins such as the NF- κ B inhibitor, I- κ B α ¹³, and the cell cycle inhibitory protein, p27^{kip1}.¹⁴ This confers a function to this chaperone in the so-called “protein triage”

that occurs in stressful conditions.¹⁵ The role of HSP27 in erythroid cell differentiation remained unexplored.

In the present study, we demonstrate that HSP27 depletion in red cell precursors provokes an increase in GATA-1 content and prevents terminal erythroid differentiation. A strict regulation of GATA-1 expression level and activity might be critical for a fine tuning of terminal erythroid differentiation, i.e. murine erythroleukemic cells overexpressing GATA-1 fail to undergo terminal differentiation in response to chemical inducers¹⁶ and embryonic stem cells overexpressing GATA-1 generate erythroid colonies whose terminal differentiation is inhibited.¹⁷ The transcription factor can be acetylated, which, on one hand, stimulates its DNA binding capability and enhances its transcriptional activity and, on the other hand, targets its ubiquitinylation and degradation by the proteasome. Likewise, mutation of the main sites of acetylation prevents GATA-1 from inducing erythroid differentiation.¹⁸ We demonstrate that, in late stages of erythroid differentiation, a phosphorylated form of HSP27 generated in a p38-dependent manner binds to acetylated GATA-1 to promote its ubiquitination and proteasomal degradation. These results identify a function for HSP27 in terminal red cell differentiation through regulating GATA-1 expression level.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture, reagents and transfections

Human erythroleukemia K562 cells were cultured in RPMI medium (BioWittaker, Fontenay-sous-Bois, France) and REG¹⁹, HeLa and COS cells in DMEM medium (BioWittaker). Each cell line was supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Gibco BRL, Erigny, France). Transfection was performed using the Jetpei™ reagent according to the manufacturer instruction (Polyplustransfection, Ozyme, St Quentin en Yvelines, France). Plasmids used were: HA-HSP27-Wt, HSP27-Ala (kindly provided by M. Gaestel, Institut für biochemie, Hanovre, Deutschland) and GATA-Myc and AcMut-GATA-1.²⁰ Empty plasmids were used as transfection controls. K562 cells were also transfected with scramble and HSP27 siRNA¹⁴ (20 nM) using INTERFERin™ according to the manufacturer's instructions (Polyplustransfection). The protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) was used at a final concentration of 5 μM for 8 h, the proteasome inhibitor MG132 (Euromedex, Souffelweyersheim, France) at 20 μM for 5 h, Trichostatin A at 300 nM for 15 h, hemin at 40 μM, SB203580 20μM (added 8 h before differentiation and then each 24 h) and G418 at 800μg/ml (all from Sigma-Aldrich).

Primary erythroblast culture

Umbilical cord blood units from normal full-term deliveries were obtained, with the agreement of mothers, from the Obstetrics Unit of Hôpital Necker-Enfants Malades. Erythroid cells were generated with a two-step amplification culture system as previously described.⁸ Briefly, CD36⁺ erythroid progenitors were generated from CD34⁺ progenitors, isolated from cord blood (Miltenyi Biotec, CD34 Progenitor Cell Isolation Kit, Paris, France), after 6 days of treatment with a cocktail of cytokines [(IL-6 (100 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml), SCF (100

ng/ml)] from Diaclone (Besancon, France). Sorted CD36⁺ erythroid progenitors were further cultured in the presence of IL-3 (10 ng/ml), SCF (100 ng/ml), Epo (Sigma-Aldrich, 2 U/ml) in IMDM (Gibco BRL) supplemented with 15% BIT 9500 (Stem Cell Technologies, Grenoble, France). When indicated, 5x10⁶ CD34⁺ progenitor cells treated for 5 days with IL-6 (100 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml), SCF (100 ng/ml) were transfected with 3 µg of HSP27 specific or scramble siRNA in a human CD34 Cell Nucleofector buffer using a Nucleofector (Amaxa Biosystems, Köln, Germany) according to the manufacturer's protocol. Cells were further cultured for 1 day with IL-6, IL-3 and SCF, then with Epo (2 U/ml), IL-3 (10 ng/ml) and, when indicated, with TGFβ (2,5 ng/ml, R&D System, Lille, France) in serum-free medium.

Primary erythroblast infection

CD34⁺ cells isolated from cord blood were cultured during 5 days as described above, then infected by adding a mix of 3 different shRNA HSP27 lentiviral particles (SH-005269-01, SH-005269-02, SH-005269-03, Thermo Scientific, Dharmacon) or shRNA lentiviral control particles (Thermo Scientific, Dharmacon). For GATA-1 overexpression, GATA-1 lentiviral particles were produced as previously described.¹¹ A second round of infection was performed 24 h later by changing fresh medium with cytokines. After 24 h, cells were extensively washed in PBS and stained with anti-CD36-APC mAb. The CD36⁺ GFP⁺ cell population was purified by cell sorting and cultured in serum-free media in the presence of IL3, SCF, and Epo.

Erythroid cell differentiation

Differentiation of primary cells in liquid culture was assessed morphologically on May-Grünwald-Giemsa (MGG)-stained smears. Primary erythroblasts and K562 cells containing heme or hemoglobin were detected by a specific reaction with a benzidine/hydrogen peroxide

solution as described.^{21,22} The final concentration of benzidine was 0.2% in 0.5 M glacial acetic acid, 3% H₂O₂ (Sigma-Aldrich). To detect the formation of reticulocytes, CD36⁺ GFP⁺ erythroid progenitors sorted cells (described above) were cultured either with Epo, IL-3 and TGFβ for 6 days as above, or in the presence of 30% FCS (HyClone, Thermo Scientific, Brebières, France) for 18 days. These culture conditions allowed the production of around 3-5% and 30-35% enucleated cells, respectively. After MGG staining⁸, the production of reticulocytes was assessed by microscopy (Leica DMRB microscope with a PLFluotar 40X oil objective) and the percentage determined on 300 cells randomly chosen in different microscopic fields.

Immunoblotting and antibodies

Proteins were separated on SDS-PAGE 10% - 8% and transferred to nitrocellulose membrane using wet transfer apparatus (BioRad, Marne-la-coquette, France). After blocking the non-specific binding sites with 5% non-fat dry milk or 5% BSA, the membranes were probed over-night with primary antibodies, and then incubated for 1 h with the appropriate secondary antibody coupled to horseradish peroxidase (DAKO, Trappes, France). Proteins were visualized using the ECL Western blotting kit (Santa-Cruz Biotechnology, Tebu-Bio, Le Perray en Yveline, France). Goat anti -GATA-1, -lamin B, -actin, rabbit anti -HSP90, -14-3-3, mouse anti -ubiquitin, -HSC70 were purchased from Santa-Cruz Biotechnology, rabbit anti-HSP27 and anti -phospho Ser15 and 78 HSP27 were from Stressgen (Tebu-Bio, Le Perray en Yveline, France), Myc-tag from Millipore (Molsheim, France), HA-tag from Biomol (Hamburg, Germany).

Immunoprecipitation

Cells were lysed in immunoprecipitation buffer [50 mM Hepes pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,2% NP40, protease inhibitor cocktail (Roche, Neuilly sur Seine, France)] for 30 min on ice followed by centrifugation at 12000g for 10 min at 4°C. The protein concentration was evaluated (*DC* protein assay, BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Except for the immunoprecipitation of endogenous GATA-1/HSP27 in K562 which was performed using the Exactacruz system (Santa-Cruz Biotechnology, sc-45039), 800 μ g of each lysate was precleared with 40 μ l of sepharose beads for 45 min and incubated with 3 μ g of GATA-1 (Santa Cruz Biotechnology), HSP27 (Stressgen), Myc-tag (Millipore) or HA-tag (Biomol) antibodies with constant agitation at 4°C. Then, the immuno-complexes were precipitated with 25 μ l of protein A/G-Sepharose (Amersham Bioscience, GE Healthcare, Orsay, France) and the beads were washed four times in 20 mM Hepes pH 7.4, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, NP40 0,2%, and resuspended in Laemmli buffer.

Ubiquitination Assay

Ubiquitinylation reactions were performed *in vitro* with Ubiquitin-Protein Conjugation Kit (Boston Biochem, Euromedex, Souffelweyersheim, France). The manufacturer's protocol was slightly modified as follows: the 55 μ L final volume reactions were performed in a buffer containing 30 μ g ubiquitin, 14.5 μ g fraction A, 14.5 μ g fraction B, 1X energy solution, 5 μ M ubiquitin-aldehyde (Boston Biochem) and 2 μ M MG132. *In vitro* translated human GATA-1 protein was used as substrate in presence or absence of *in vitro* translated human HSP27. Both proteins were produced using TNT Quick Coupled Transcription/Transcription System (Promega, Charbonnieres-les-Bains, France) as follows: 1 μ g of template plasmid DNA was added to the reaction mixture which was afterwards incubated at 30°C for 90 min. 3 μ l of the *in vitro* translated proteins were pre-incubated with ubiquitin-aldehyde at 37°C for 6 min before adding the ubiquitinylation reaction mix. Samples were incubated at 37°C for 3h30 and

the reaction was stopped by adding Laemmli buffer. The samples were boiled 5 min and then resolved on SDS-PAGE

Nucleus/cytoplasm extraction

Cytoplasm and nucleus extracts were obtained after lysis of $5-10 \times 10^6$ cells for 10 minutes on ice in lysis buffer (20 mM Hepes pH 7.4, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol) with 0.2% NP-40 in the presence of protease inhibitors. Cell lysates were centrifugated at 14,000 rpm for 10 min and the supernatant was carefully collected (cytoplasm fraction). The pellet was washed once and resuspended in lysis buffer (20 mM Hepes pH 7.4, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 20% glycerol, 350 mM NaCl, protease inhibitors) and nuclear fractions were harvested after centrifugation (14000 rpm, 10 min).

Proteasome activity

Proteasome activity was determined as described.^{13,14} Briefly, 4×10^6 cells in 200 μ l PBS (pH 7.4) were incubated for 30 min at 37°C with 100 μ M of the cell-permeant fluorogenic substrate N-succinyl-L-leucyl-L-leucyl-L-tyrosine-7-amido-4-methyl coumarin (Bachem, Basel, Switzerland). Fluorescence generated by the substrate cleavage was quantified using a Kontron SFM 25 spectrofluorometer (Kontron AG., Zurich, Switzerland). When needed, proteasome activity was inhibited by exposure of the cells to MG132 (Euromedex).

Immunofluorescence staining

Cells were fixed in PBS-paraformaldehyde 4% during 15 min and permeabilized by incubation with PBS-Triton 0.1% for 3 min. After washing with PBS (Cambrex, Emerain ville, France), samples were saturated with PBS-BSA 3% (Sigma-Aldrich) during 30 min before incubation overnight at 4°C with anti-HSP27 (Stressgen), anti-phospho-Ser15-HSP27

(Stressgen) or anti-GATA-1 (Santa-Cruz Biotechnology). After 4 washes in PBS, appropriate secondary antibodies coupled with fluorochromes (Alexa 486 and 568 nm; Molecular Probe, Leiden, Netherlands) were added during 1h at room temperature in the dark. The nucleus was labelled with Hoescht 33342. Images were acquired using the Cell Observer station (Zeiss, Germany).

Statistics

Quantitative experiments were analyzed using Student *t* test. All *P* values resulted from the use of 2-sided tests.

Results

Expression of GATA-1 and HSP27 during terminal erythroid differentiation

The expression of GATA-1 and HSP27 expression was studied in two models of erythroid cells differentiation. CD34⁺ cells isolated from human cord blood were cultured in the presence of interleukin-6 (IL-6, 100 ng/ml), interleukin-3 (IL-3, 10 ng/mL) and stem cell factor (SCF, 100 ng/mL) for 5 days before sorting CD36⁺ cells. The following day, the medium was changed and CD36⁺ cells were cultured for the indicated additional days with Epo (2 U/mL) and IL-3 (10 ng/mL) (Figure 1A). When indicated, TGFβ (2.5 ng/mL) was added to accelerate the differentiation process.²³ In this way, days 1, 2 and 3 in the presence of TGFβ, shown in Figure 1A, correspond to days 2, 4 and 6 in the absence of TGFβ. GATA-1 levels were quite constant during erythroblasts differentiation (Figure 1B). Addition of cycloheximide (5μM) for 4 h before collecting the cells indicated that GATA-1 turnover was faster at day 8 compared to day 3 (Figure 1C). Inhibition of the proteasome machinery at day 8 with either MG132 (20 μM, 5 h Figure 1D) or lactacystin (25 μM, 4h, not shown) induced an accumulation of the protein in the nucleus (Figure 1D), indicating that the proteasomal degradation of GATA-1 was involved in its turnover. In human erythroid K562 cells induced to differentiate in the presence of hemin (40 μM), the expression of GATA-1 decreased during erythroid differentiation (Figure 1E). This decrease was partially prevented by MG132 (Figure 1F) and lactacystin (not shown). GATA-1 decrease correlated with an increase in the proteasome activity measured in cell lysates (Figure 1G) and ubiquitinated proteins in the nucleus of differentiated cells in the presence of MG132 (Figure 1F). Since HSP27 is expressed throughout the differentiation process in both models (Figures 1B, 1C, 1E and 1F) and partially accumulates in the nucleus of differentiating cells (Figure 1D and 1F), we explored whether HSP27 was involved in GATA-1 protein level regulation.^{13,14}

HSP27 depletion inhibits terminal erythroid differentiation.

HSP27 was depleted from sorted CD36⁺ cells by transfection with a specific siRNA (siHSP27). As described in Figure 1A, the medium was changed after 24 h and the cells were cultured with Epo and IL-3, in the presence of TGFβ to accelerate and synchronize the differentiation process. The efficacy of HSP27 siRNA was checked by immunoblot at d2 (Figure 2A, insert). The decrease in HSP27 protein expression was associated with a delay in the appearance of benzidine-positive cells (Figure 2A) and in the morphologic maturation of erythroblasts, e.g. the d2 ratio of polychromatic (mature) to basophilic (immature) erythroblasts decreased from 59+/-2% in control siRNA to 36+/-4.5 % in HSP27-siRNA transfected cells ($P < 0.05$). This decrease was not related to an increase in mature cell death rate when HSP27 was down-regulated (supplementary Figure 1A and 1B). CD36⁺ sorted cells were also transduced with a lentivirus encoding either a HSP27 specific (shHSP27) or a scrambled shRNA (Figure 2B, insert) and cultured either with Epo, IL-3 and TGFβ for 6 days as above, or in the presence of 30% FCS for 18 days, which led to the production of around 3-5% and 30-35% enucleated cells, respectively. In both conditions, HSP27 depletion induced a significant decrease in the formation of reticulocytes (Figures 2B) without affecting erythroblast cell death and proliferation (not shown). The siRNA HSP27 was also used to decrease HSP27 expression in K562 cells, which delayed the hemin-induced erythroid differentiation (Figure 2C).

In both, CD36⁺ sorted cells (Figure 2A) and K562 cells (Figure 2C), HSP27 depletion correlated with an increase in GATA-1 protein level. As previously reported in mouse models^{16,17}, lentivirus-mediated GATA-1 overexpression in sorted human CD36⁺ cells (Figure 3A, insert) significantly delayed the appearance of benzidine positive cells in a TGFβ containing medium (Figure 3A). GATA-1 overexpression delayed the morphologic

maturation of erythroblasts, e.g. the d2 ratio of polychromatic (mature) to basophilic (immature) erythroblasts decreased from 59+/-2% in control to 36+/-4.5 % in GATA-1-transduced cells ($P < 0.05$), and impaired the formation of reticulocytes (not shown). As for HSP27 depletion, GATA-1 overexpression affected erythroblast maturation without significantly altering cell proliferation or survival (Supplementary Fig 1C and D). We also overexpressed GATA-1 in K562 cells by transient transfection with a Myc-tagged GATA-1 construct (Figure 3B, insert). As shown in Figure 3B, overexpression of the transcription factor delayed the appearance of benzidine-positive cells upon exposure to hemin. Altogether, HSP27 depletion was associated with GATA-1 accumulation and both HSP27 depletion and GATA-1 overexpression delayed erythroid cell differentiation.

HSP27 favours GATA-1 degradation by the proteasome.

We have shown previously that HSP27 was an ubiquitin-binding protein involved in the proteasomal degradation of certain proteins under stress conditions.^{13,14} To explore whether HSP27 could regulate GATA-1 degradation, we performed an *in vitro* assay. Addition of purified HSP27 to Myc-tagged GATA-1 protein in the presence of ubiquitin favoured the appearance of ubiquitinated forms of GATA-1, which was better evidenced when the proteasome was inhibited by MG132 (Figure 4A). Ubiquitinated forms of GATA-1 induced by HSP27 were also rapidly degraded *in vivo*, as observed in K562 cells transiently transfected with HSP27 and an ubiquitin construct (Supplementary figure 2). Co-transfection of a Myc-tagged GATA-1 and a HA-tagged HSP27 in HeLa cells induced the degradation of GATA-1, which was prevented by MG132 (Figure 4B). Similar results were obtained in transiently transfected COS cells (not shown). Acetylation of GATA-1 was demonstrated to precede its ubiquitination.²⁰ The histone deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA), which enhances the amount of acetylated proteins in the cells, strongly stimulated HSP27-induced

degradation of GATA-1 (Figure 4C). Transfection experiments in HeLa cells demonstrated that HSP27 failed to induce the degradation of AcMut-GATA-1, a GATA-1 mutant in which the acetylation sites have been mutated (Figure 4D). These results suggested that HSP27 could promote the ubiquitination of acetylated GATA-1 and its degradation by the proteasome.

Phosphorylated HSP27 localizes in erythroid cell nucleus to interact with GATA-1

Co-immunoprecipitation experiments performed in COS cells expressing Myc-tagged GATA-1 and HA-tagged HSP27 demonstrated an interaction between the two proteins (Figure 5A). A transient interaction between the two endogenous proteins, GATA-1 and HSP27, could also be detected in nuclear extracts of CD36⁺ primary cells exposed for 8-9 days to IL-3 and Epo (Figure 5B) and in hemin-treated K562 cells by day 1-2 (Figure 5C). Human HSP27 can be reversibly phosphorylated at serine S15, S78 and S82 by kinases of the p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) family, more specifically by MAPKAPK 2/3, downstream of p38 α kinase.^{15,24-26} This phosphorylating event was observed during erythroid differentiation.²⁷ By using antibodies that recognize HSP27 when phosphorylated on S15 or S78, we confirmed the accumulation of the phosphorylated small stress protein in CD36⁺ exposed for 8-10 days to IL-3 and Epo (Figure 6A) and in hemin-treated K562 cells by day 1-2 (Figure 6C). In both cellular models, phosphorylated HSP27 localized in the nucleus (Figure 6B, 6D and cell fractionation studies in Supplementary Figure 3). An inhibitor of MAPK p38 pathway (SB-203580) prevented the phosphorylation of HSP27 in hemin-treated K562 cells (Figure 6E) in which the phosphorylated HSP27 was shown to interact with GATA-1 (Figure 6F). Expression of wild-type HSP27 or a non-phosphorylatable HSP27 mutant (HA-HSP27-Ala) in K562 cells demonstrated that the HSP27-Ala mutant did not significantly interact with the transcription factor (Figure 7A). Interestingly, the HSP27-Ala mutant did not localize within

the nucleus during erythroid differentiation (Figure 7B) and did not induce GATA-1 degradation (Figure 7A and C), which was further confirmed in HeLa cells stably overexpressing HSP27-Ala and transiently transfected with Myc-GATA-1 (Figure 7D). Altogether, phosphorylation of HSP27 that is inhibited by SB-203580 is required for modulation of acetylated GATA-1 level in the nucleus of erythroid cells (Figure 8).

Discussion

GATA-1 levels and activity must be tightly regulated for proper erythroblast differentiation, i.e. *gata-1* gene deletion is responsible for embryonic lethality through erythroid differentiation arrest and apoptosis of erythroid progenitors²⁸ and GATA-1 overexpression arrests cell differentiation and causes mouse embryonic lethality as well.¹⁷ The present study identifies HSP27 as one of the proteins that regulate GATA-1 expression level and activity along erythroid cell differentiation. More specifically, our results suggest that HSP27 promotes the ubiquitinylation and proteosomal degradation of the transcription factor when acetylated.²⁰ This biological effect of HSP27 requires its phosphorylation on serine residues, probably by a p38-dependent mechanism (Figure 8). The small stress protein HSP27 was previously shown to favour the ubiquitination and proteasomal degradation of the NF- κ B inhibitor, I- κ B α ¹³, and the cell cycle protein p27^{kip1}¹⁴, which suggested that driving the selective degradation of proteins was part of its protective role of in stressed cells. Here, we demonstrate that HSP27-driven ubiquitination and proteasomal degradation of the transcription factor GATA-1 contributes to the normal differentiation of erythroid cells.

Ubiquitination requires an enzyme cascade that includes an E1-activating enzyme, an E2-conjugating enzyme, an E3-ligase and, at least in some situations, E4 factors that increase ubiquitination efficiency in a substrate-specific manner, either by accelerating the transfer of

ubiquitin chains to the substrate or merely by providing a scaffold.²⁹ Our data suggest that HSP27 is a scaffold protein for GATA-1 and triggers its ubiquitination and degradation when acetylated, which, in human primary erythroblasts, does not affect GATA-1 expression but affects its turnover. The reason why the GATA-1 turnover is increased remains elusive but our results indicate that a tightly regulated balance between HSP27 and deacetylases/acetylases may regulate the erythroid differentiation program through modulation of GATA-1 cellular content.

Phosphorylation of GATA-1 by MAP kinases precedes the transcription factor acetylation and participates to the control of its expression.²⁰ Human HSP27 is also phosphorylatable on three serine residues (S15, S78 and S82) and this reversible post-translational modification is mediated by p38 MAP kinases. (Figure 8) More specifically, the process was demonstrated in cells exposed to a variety of stimuli to be catalyzed mainly by MAPKAP kinase-2, a downstream target of p38 α (Figure 8).^{30,31} HSP27 phosphorylation modulates the protein oligomerization by provoking a shift toward small oligomers.¹⁵ Non-phosphorylatable (HSP27-Ala) mutants of the protein protects the cells from caspase-mediated apoptosis³² and binds to actin³³ whereas a constitutively phosphorylated (HSP27-Asp) mutant interacts with Daxx.³⁴ The phosphorylated HSP27 also displays higher affinity for ubiquitin chains than wild type protein.^{13,14} The present study suggests that HSP27 phosphorylation is required for the protein to localize in the nucleus, to interact with GATA-1 and to trigger its proteosomal degradation. The HSP27 phosphorylation may account for the function of the p38 MAPK cascade in erythroid cell differentiation.²⁷ It may be of interest to determine whether overactivation of the p38 MAPK pathway, which has been associated with altered erythropoiesis in some myelodysplastic syndromes, could affect GATA-1 turnover and expression level.³⁵

The stress-inducible HSP27 and HSP70 are abundantly expressed during erythroblast differentiation. We previously demonstrated that HSP70 protected GATA-1 from caspase-mediated cleavage when caspase-3 was transiently activated along the differentiation process.¹¹ We show here that HSP27 is involved in the increased GATA-1 turnover that precedes the terminal stages of erythroid cell differentiation. HSP70 is an ATP dependent chaperone while HSP27 does not require ATP for inhibiting the aggregation of misfolded proteins.³⁶ The two stress proteins cooperate to modulate the stability of AU-rich labile mRNAs,³⁷ and to trigger resistance of cancer cells to DNA damaging inducing agents.^{38,39} Based on their role in the regulation of GATA-1 expression and function, a deregulation of either HSP27 or HSP70 or both could possibly play a role in the pathogenesis of some congenital or acquired erythroid disorders.^{40,41}

Altogether, our data suggest that the coordinated molecular events that tightly control the expression of GATA-1 along erythroid cell differentiation could include the MAPK-mediated phosphorylation of GATA-1, which provokes its acetylation leading to an increased transcriptional activity. Meanwhile, MAPK-mediated phosphorylation of HSP27 favours its nuclear localization. In the nucleus, interaction between phosphorylated HSP27 and acetylated GATA-1 may lead to GATA-1 ubiquitination and subsequent proteosomal degradation (Figure 8). Chaperones play several key functions in the control of normal erythropoiesis that include the control of globin folding and expression⁴² as well as GATA-1 integrity.¹¹ The present study adds a new function for a chaperone in GATA-1 turnover. Proteins from an additional stress-inducible protein sub-family, HSP90, are expressed in erythroid cells undergoing differentiation and their function is the process remains to be explored, which may be of importance since HSP90 inhibitors are now developed in cancer treatment.^{43,44}

Acknowledgements

We thank A Bouchot for its excellent technical assistance and P. Vyas for critically reading the manuscript. This work was supported by grants from the “ANR” and “INCa”. CG and ES lead teams “Labellisées” from the “Ligue Nationale contre le Cancer”. AdT is recipient of a post-doctoral fellowship from ARC (association pour la recherche sur le cancer), SS has a post-doctoral fellowship from the “Conseil Regional de Bourgogne”, MB is recipient of a doctoral fellowship from the “Ligue Nationale contre le Cancer”. JV, DL and SM have fellowships from the Ministère de l’Education de France

Authorship

AdT and J.V designed experiments, performed research and analyzed data. D.L., S.K., M.B., G.C., S.M., Y.Z., JA.R, performed research and analyzed data. J.B. provided mutant GATA plasmid constructs and analyzed data. C.G. and O.H. supervised the experiments and C.G., O.H. and E.S directed the work and wrote the paper.

Bibliography

1. Pevny L, Simon MC, Robertson E, et al. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature*. 1991;349:257-260.
2. Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol*. 2005;25:1215-1227.
3. Weiss MJ, Orkin SH. Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:9623-9627.
4. Gregory T, Yu C, Ma A, Orkin SH, Blobel GA, Weiss MJ. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood*. 1999;94:87-96.
5. Motoyama N, Kimura T, Takahashi T, Watanabe T, Nakano T. bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *J Exp Med*. 1999;189:1691-1698.
6. De Maria R, Zeuner A, Eramo A, et al. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*. 1999;401:489-493.
7. Gregoli PA, Bondurant MC. Function of caspases in regulating apoptosis caused by erythropoietin deprivation in erythroid progenitors. *J Cell Physiol*. 1999;178:133-143.

8. Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, et al. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med.* 2001;193:247-254.
9. Kolbus A, Pilat S, Husak Z, et al. Raf-1 antagonizes erythroid differentiation by restraining caspase activation. *J Exp Med.* 2002;196:1347-1353.
10. Carlile GW, Smith DH, Wiedmann M. Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood.* 2004;103:4310-4316.
11. Ribeil JA, Zermati Y, Vandekerckhove J, et al. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature.* 2007;445:102-105.
12. Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med.* 2008;12:743-761.
13. Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S, et al. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Mol Cell Biol.* 2003;23:5790-5802.
14. Parcellier A, Brunet M, Schmitt E, et al. HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27Kip1 and helps S-phase re-entry in stressed cells. *Faseb J.* 2006;20:1179-1181.
15. Garrido C, Solary E. A role of HSPs in apoptosis through "protein triage"? *Cell Death Differ.* 2003;10:619-620.
16. Whyatt DJ, Karis A, Harkes IC, et al. The level of the tissue-specific factor GATA-1 affects the cell-cycle machinery. *Genes Funct.* 1997;1:11-24.
17. Whyatt D, Lindeboom F, Karis A, et al. An intrinsic but cell-nonautonomous defect in GATA-1-overexpressing mouse erythroid cells. *Nature.* 2000;406:519-524.
18. Hung HL, Lau J, Kim AY, Weiss MJ, Blobel GA. CREB-Binding protein acetylates hematopoietic transcription factor GATA-1 at functionally important sites. *Mol Cell Biol.* 1999;19:3496-3505.
19. Caignard A, Genne P, Olsson NO, Oriol R, Martin F. F11C antigen: a membrane marker able to distinguish two regressive and progressive variants from a rat colon adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 1990;46:633-639.
20. Hernandez-Hernandez A, Ray P, Litos G, et al. Acetylation and MAPK phosphorylation cooperate to regulate the degradation of active GATA-1. *Embo J.* 2006;25:3264-3274.
21. Rutherford TR, Clegg JB, Weatherall DJ. K562 human leukaemic cells synthesise embryonic haemoglobin in response to haemin. *Nature.* 1979;280:164-165.
22. Gambari R, Raschella G, Biagini R, et al. Predominant expression of zeta and epsilon globin genes in human leukemia K-562(S6) variant cell line. *Experientia.* 1983;39:415-416.
23. Panzenbock B, Bartunek P, Mapara MY, Zenke M. Growth and differentiation of human stem cell factor/erythropoietin-dependent erythroid progenitor cells in vitro. *Blood.* 1998;92:3658-3668.
24. Landry J, Lambert H, Zhou M, et al. Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II. *J Biol Chem.* 1992;267:794-803.
25. Stokoe D, Engel K, Campbell DG, Cohen P, Gaestel M. Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett.* 1992;313:307-313.
26. Maizels ET, Peters CA, Kline M, Cutler RE, Jr., Shanmugam M, Hunzicker-Dunn M. Heat-shock protein-25/27 phosphorylation by the delta isoform of protein kinase C. *Biochem J.* 1998;332 (Pt 3):703-712.
27. Uddin S, Ah-Kang J, Ulaszek J, Mahmud D, Wickrema A. Differentiation stage-specific activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms in primary human erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:147-152.

28. Orkin SH. Embryonic stem cells and transgenic mice in the study of hematopoiesis. *Int J Dev Biol.* 1998;42:927-934.
29. Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6:599-609.
30. Garrido C, Mehlen P, Fromentin A, et al. Inconstant association between 27-kDa heat-shock protein (Hsp27) content and doxorubicin resistance in human colon cancer cells. The doxorubicin-protecting effect of Hsp27. *Eur J Biochem.* 1996;237:653-659.
31. Rouse J, Cohen P, Trigon S, et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell.* 1994;78:1027-1037.
32. Bruyey JM, Paul C, Fromentin A, et al. Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Oncogene.* 2000;19:4855-4863.
33. During RL, Gibson BG, Li W, et al. Anthrax lethal toxin paralyzes actin-based motility by blocking Hsp27 phosphorylation. *Embo J.* 2007;26:2240-2250.
34. Charette SJ, Lavoie JN, Lambert H, Landry J. Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol Cell Biol.* 2000;20:7602-7612.
35. Navas TA, Mohindru M, Estes M, et al. Inhibition of overactivated p38 MAPK can restore hematopoiesis in myelodysplastic syndrome progenitors. *Blood.* 2006;108:4170-4177.
36. Liberek K, Lewandowska A, Zietkiewicz S. Chaperones in control of protein disaggregation. *Embo J.* 2008;27:328-335.
37. Sinsimer KS, Gratacos FM, Knapinska AM, et al. Chaperone Hsp27, a novel subunit of AUF1 protein complexes, functions in AU-rich element-mediated mRNA decay. *Mol Cell Biol.* 2008;28:5223-5237.
38. Jaattela M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res.* 1999;248:30-43.
39. Didelot C, Lanneau D, Brunet M, et al. Anti-cancer therapeutic approaches based on intracellular and extracellular heat shock proteins. *Curr Med Chem.* 2007;14:2839-2847.
40. Patmasiriwat P, Fraizer G, Kantarjian H, Saunders GF. WT1 and GATA1 expression in myelodysplastic syndrome and acute leukemia. *Leukemia.* 1999;13:891-900.
41. Fadilah SA, Cheong SK, Roslan H, Rozie-Hanisa M, Yen GK. GATA-1 and GATA-2 gene expression is related to the severity of dysplasia in myelodysplastic syndrome. *Leukemia.* 2002;16:1563-1565.
42. Weiss MJ, dos Santos CO. Chaperoning erythropoiesis. *Blood.* 2009;113:2136-2144.
43. Peng C, Li D, Li S. Heat shock protein 90: a potential therapeutic target in leukemic progenitor and stem cells harboring mutant BCR-ABL resistant to kinase inhibitors. *Cell Cycle.* 2007;6:2227-2231.
44. Taldone T, Gozman A, Maharaj R, Chiosis G. Targeting Hsp90: small-molecule inhibitors and their clinical development. *Curr Opin Pharmacol.* 2008;8:370-374.

Figure legends

Figure 1

HSP27 and GATA-1 expression during erythroblasts differentiation. (A) Scheme of the model used of human primary erythroblasts differentiation. A representative microscopic image shows the morphology of the differentiating erythroblasts at the indicated time points. (B) Human primary erythroblasts were induced to differentiate in the presence of IL3, Epo with or without TGF β . At the indicated times, the level of GATA-1 and HSP27 was determined by western blot. HSC70 serves as loading control. (C) Differentiating cells were treated or not with the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX, 5 μ M, 8 h). Cells were harvested at indicated days and lysates were blotted with the indicated antibodies. The data are representative of three independent experiments. (D) Human primary erythroblasts induced to differentiate in the presence of IL3 and Epo were, at day 8, treated or not with the proteasome inhibitor MG132 (20 μ M, 5 h), and nuclear/cytosolic GATA-1 and HSP27 expression was assessed by western blotting. (E) Human K562 cells were induced to differentiate with hemin (40 μ M). At the indicated days, GATA-1 and HSP27 levels were assessed by western blot. HSP90 serves as a loading control. (F) When indicated, K562 cells induced to differentiate by the presence of hemin, were treated for 5 h with the proteasome inhibitor MG132 (20 μ M). Nuclear/cytosolic GATA-1 and HSP27 expression was assessed by western blot. HSC70 and lamin B serve as loading controls. (G) The proteasome activity was determined by the measurement of Suc-LLVY-AMC cleavage in the control lysates from hemin treated K562 cells in the absence (white columns) or presence (gray columns) of MG132 (20 μ M, 5 h), (a.u.: arbitrary units; bars: SD n=3).

Figure 2

HSP27 depletion delays erythroid differentiation of human primary erythroblasts and

K562 cells (A) Human primary erythroblasts were induced to differentiate with Epo, IL-3 and TGF β (2.5 ng/ml) after 24 h of transfection with HSP27 siRNA (siHSP27, Δ) or control siRNA (Ctrl, \blacksquare) (20 nM). At the days indicated (day 0 to day 3) the percentage of differentiated cells was evaluated by benzidine assay. Insert, cell lysate from day 2 was resolved on a gel and blotted with the indicated antibodies. (B) CD34⁺ cells, growing in presence of cytokines (IL3, Epo), were transduced with shRNA specific for HSP27 or shRNA control (Ctrl). At day 5, CD36⁺ GFP⁺ cells were sorted and differentiated in the presence of 30% SVF or TGF β (2.5 ng/ μ l) to allow the production of reticulocytes. Insert, western-blot analysis of HSP27 expression after shRNA transduction. Actin serves as a loading control. Reticulocytes were quantified at the indicated times as the ratio of their number to a total number of 300 cells chosen randomly in different microscopic fields. (C) Human K562 cells were induced to differentiate with hemin (40 μ M) after 24 h of transfection with HSP27 siRNA (siHSP27, gray columns) or a scrambled (Ctrl, white columns). The percentage of differentiated cells was determined by benzidine assay. Insert, cell lysate from day 0 and 2 was resolved on a gel and blotted with the indicated antibodies.

Figure 3

GATA-1 overexpression impairs erythroid differentiation. (A) Primary erythroblasts were transduced three times with an empty lentivirus construct (\blacksquare) or one encoding GATA-1 (Δ). Then, differentiation was induced as in Fig 1A. The percentage of differentiated cells was evaluated by benzidine assay at the indicated times. (B) K562 cells were transiently transfected with empty plasmid (white columns) or with Myc-GATA-1 (gray columns). After 24 h, differentiation was induced with hemin (40 μ M). The percentage of differentiated cells

was evaluated by benzidine assay at the indicated times. GATA-1 expression was monitored by western blotting. HSC70 is the loading control. Data are expressed as the mean +/- S.E (n=3; *, p<0.05).

Figure 4

HSP27 induces GATA-1 ubiquitination and proteasomal degradation. (A) Recombinant GATA-1 protein, generated with TNT T7 coupled reticulocyte lysate system, was incubated in presence or absence of recombinant ubiquitin (Ub) and HSP27 for 40 min in an ubiquitin buffer, as described in material and methods. The reaction was stopped with Laemmli buffer, run on a gel and blotted with the Myc-tag (GATA-1) antibody. The smear corresponds to the different forms of ubiquitinated GATA-1. (B) HeLa cells were transiently transfected with HA-HSP27 and Myc-GATA-1 plasmids and treated or not with MG132 (20 μ M, 5 h). GATA-1 content was analyzed by immunoblot. HSC70 is the loading control. (C) HeLa cells were transiently transfected with Myc-GATA-1 or both Myc-GATA-1 and HA-HSP27. Cell extracts from cells either left untreated or treated with TSA (300 nM, 16 h) were resolved on a gel and immunoblotted with Myc-tag (GATA-1). HSC70 and 14-3-3 are loading controls. (D) HeLa cells were transiently transfected with Myc-GATA-1 or the acetyl mutant GATA-1 (AcMut-GATA-1) in the presence or absence of HA-HSP27. After 24 h of transfection, expression of GATA-1 and HSP27 was assessed by western-blot. Lower panel, densitometry analysis to quantify HSP27-induced degradation of GATA-1. One representative blot out of three performed is shown.

Figure 5

HSP27 interacts with GATA-1. (A) COS cells were co-transfected or not with Myc-GATA-1 and HA-HSP27. GATA-1 was immunoprecipitated from cell extracts, subjected to SDS-

PAGE migration and immunoblotted with HA-tag (HSP27) antibody. (B) Nuclear extracts from differentiating progenitors CD36⁺ cells were subjected to immunoprecipitation using GATA-1 antibody and blotted with HSP27 antibody. (C) Immunoprecipitation of endogenous GATA-1 (left panel) or HSP27 (right panel) from K562 cell lysates at indicated times of differentiation was followed by HSP27 and GATA-1 immunoblotting. IPctl, immunoprecipitation with a non relevant antibody.

Figure 6

HSP27 phosphorylation is required for its association with GATA-1 and to induce GATA-1 degradation. (A) Human primary CD36⁺ erythroblasts were induced to differentiate in the presence of IL3, and Epo. Phosphorylated HSP27 expression (on S15) was assessed at the indicated days by western blotting. Actin serves as a loading control. (B) Localization of S15-phosphorylated HSP27 during Epo-induced CD36⁺ differentiation. Immunofluorescence was performed as described in material and methods. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (1 µg/ml), (Magnification *40, — 10 µm). (C) Phosphorylated HSP27 (on S15) was determined by western blot in K562 erythroid cells treated with hemin. HSC70 serves as loading control. (D) Localization by immunofluorescence studies of S15-phosphorylated HSP27 during hemin induced K562 differentiation (day 0 to day 2). (Magnification *40, — 10 µm) (E) Phosphorylated HSP27 (both on S15 and S78) was determined in lysates from K562 cells induced to differentiate with hemin (day 0 to day 3) in the presence or absence of the p38 pathway inhibitor SB-203580 (20 µM). (F) At the indicated days after hemin treatment of K562 cells, GATA-1 was immunoprecipitated followed by immunoblotting with P-Ser15-HSP27 and P-Ser78-HSP27 antibodies. IPctl, immunoprecipitation with a non relevant antibody.

Figure 7

A non phosphorylatable mutant of HSP27 does not localize in the nucleus and does not bind to GATA-1 to induce its degradation. (A) K562 cells transiently transfected with HA-HSP27-Wt, HA-HSP27-Ala or a control vector, treated or not with MG132 (20 μ M, 5 h), were immunoprecipitated with GATA-1 before immunoblotting with HSP27 (HA) and GATA-1 antibodies. IPctl, immunoprecipitation with a non relevant antibody. (B) K562 cells were transiently transfected with HA-HSP27-Wt and HA-HSP27-Ala. Localization of the transfected HSP27 forms was determined by immunofluorescence after 24 h of hemin treatment. (Magnification $\times 100$, $- 10 \mu$ m) (C) GATA-1 content was determined by western blot in duplicate in K562 cells expressing a control vector, HA-HSP27-Wt or HA-HSP27-Ala. (D) GATA-1 content was determined by western blot in HeLa cells stably overexpressing HA-HSP27-Wt, HA-HSP27-Ala or a control vector and transiently transfected with Myc-GATA-1. When indicated, cells were treated with MG132 (20 μ M, 5 h). HSC70 was used as a loading control.

Figure 8

Proposed model for the coordinated molecular events that may control GATA-1 level and erythroblasts differentiation. Activation of p38MAPK during erythropoiesis was described previously to promote GATA-1 phosphorylation and acetylation²⁷ and to phosphorylate HSP27 through MAPKAPK2 activation^{25,27}. The present study indicates that phosphorylated HSP27 accumulates in the nucleus and interacts with GATA-1 to induce its ubiquitination and proteasomal degradation. GATA-1 acetylation precedes its degradation by the proteasomal machinery. This model provides new evidences of the major role of chaperones in erythropoiesis.⁴² **, is a reference to data from the literature as mentioned above.

Figure 1

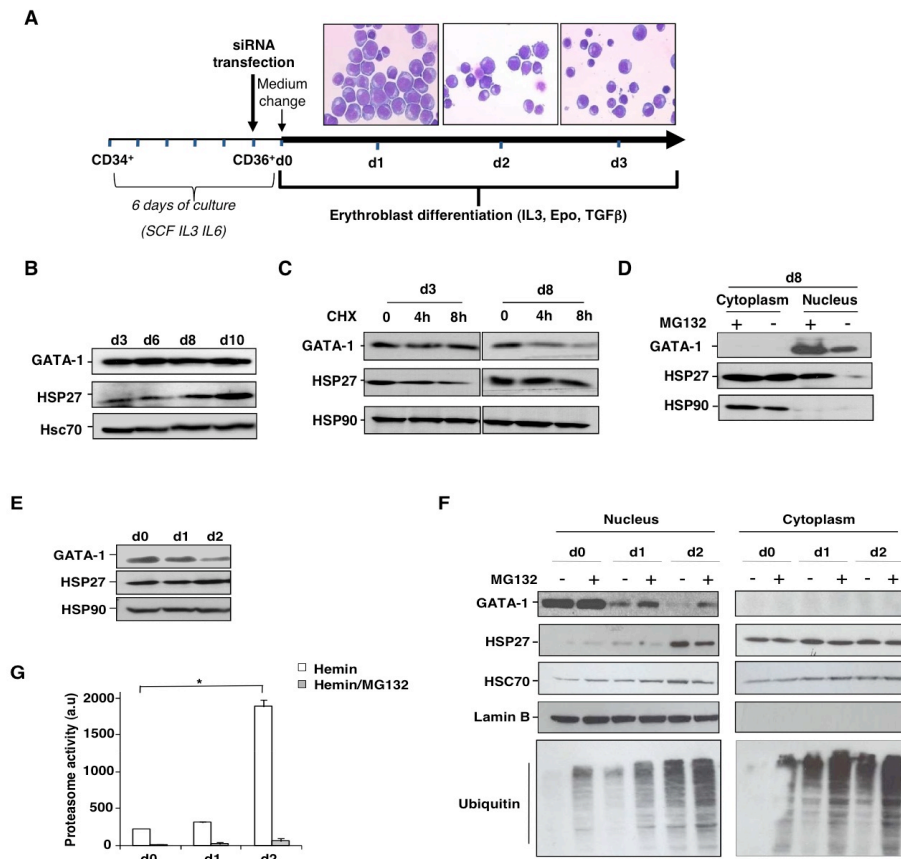


Figure 2

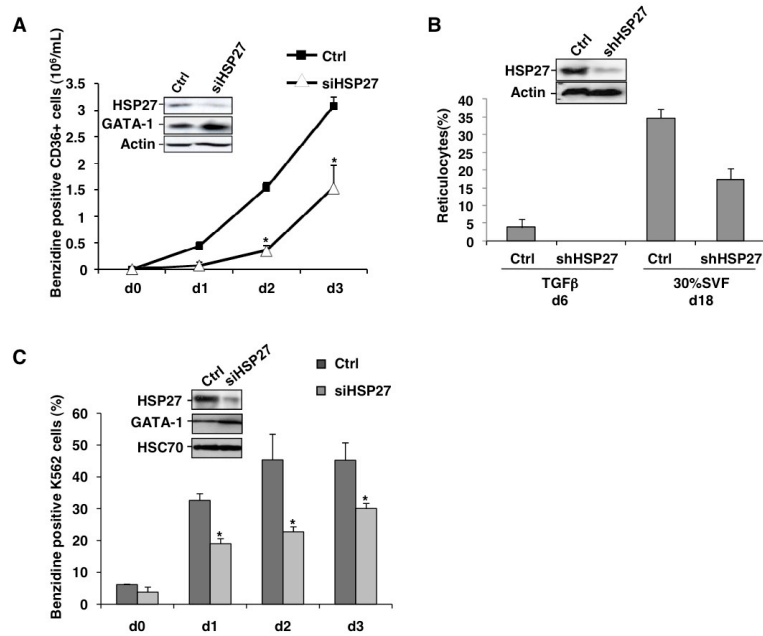


Figure 3

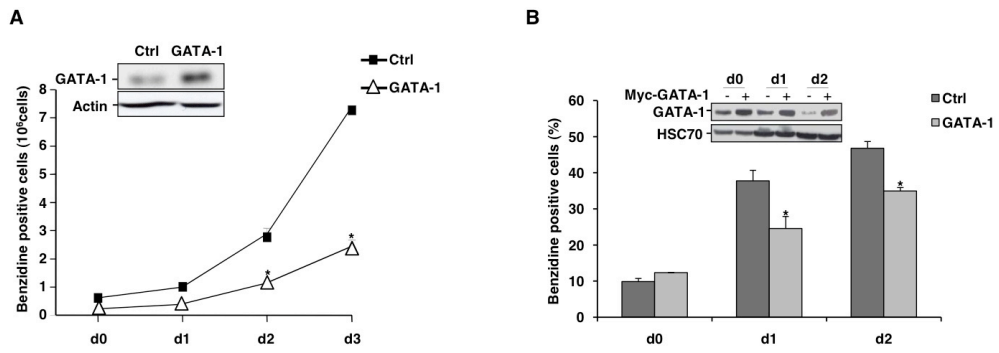


Figure 4

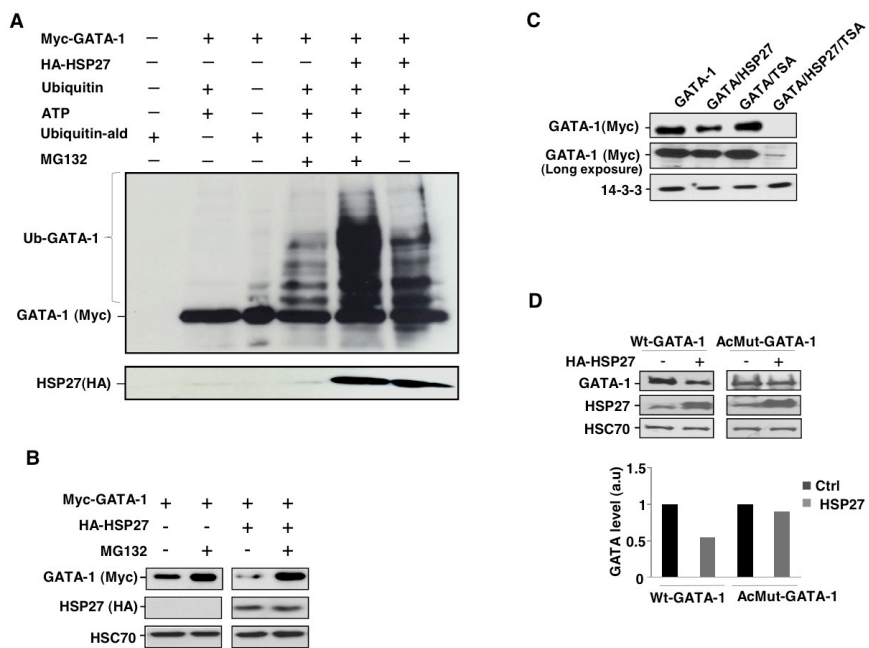


Figure 5

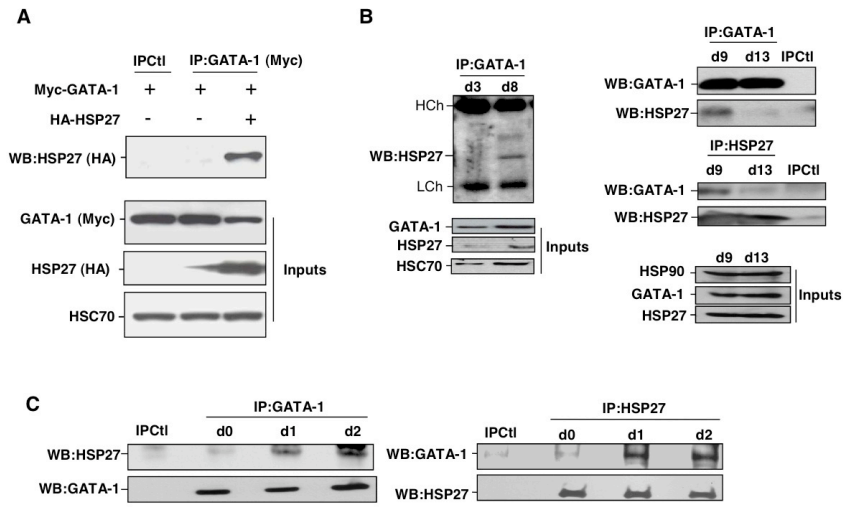
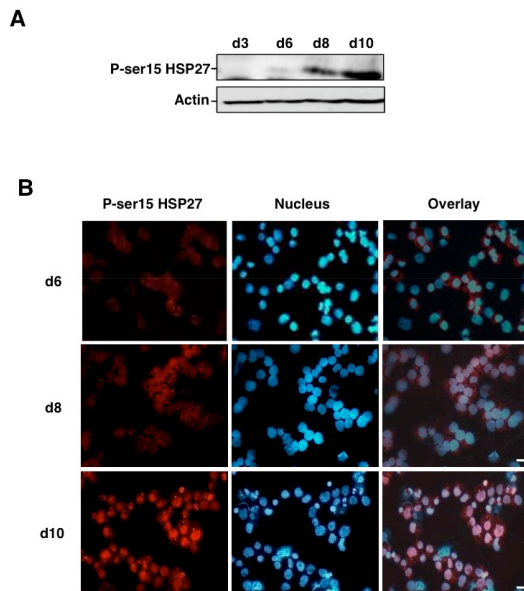


Figure 6



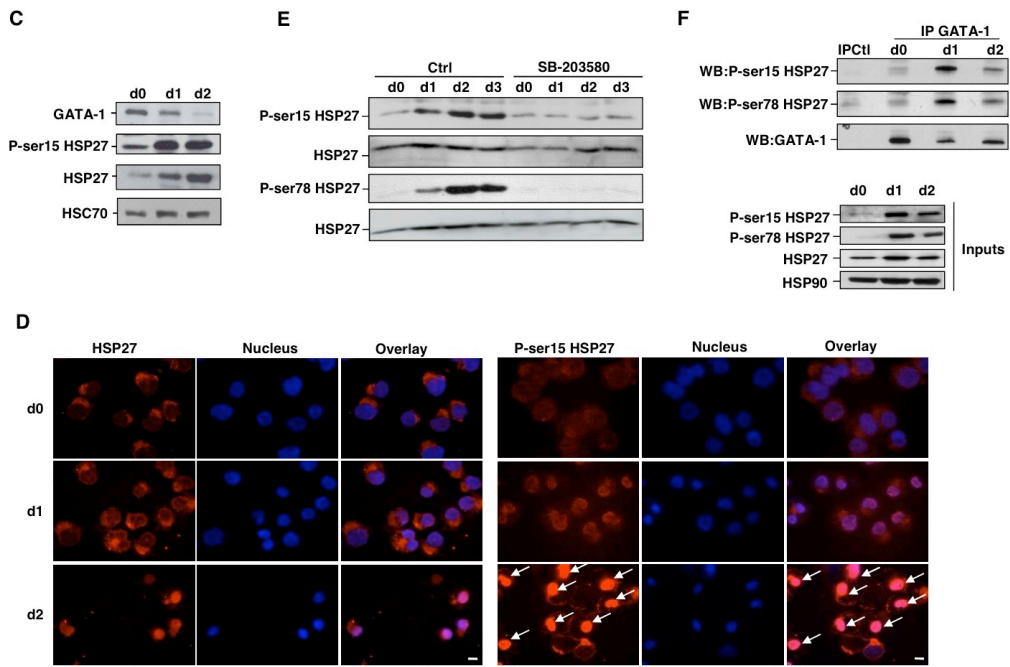


Figure 7

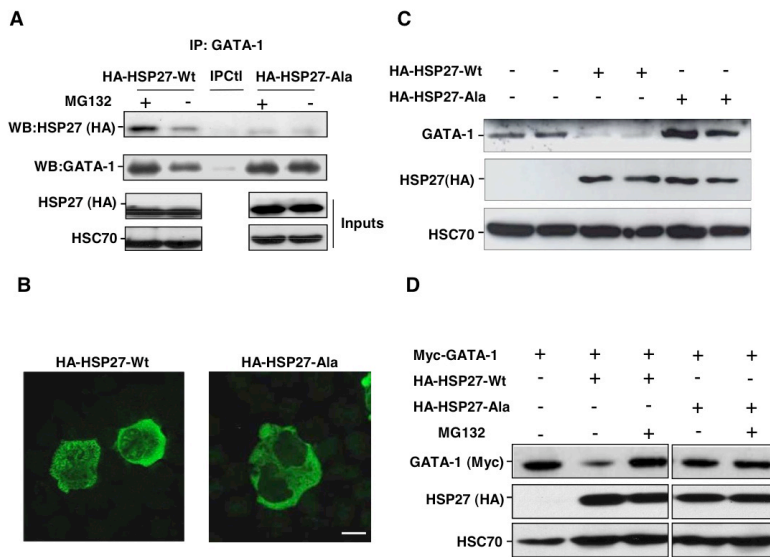
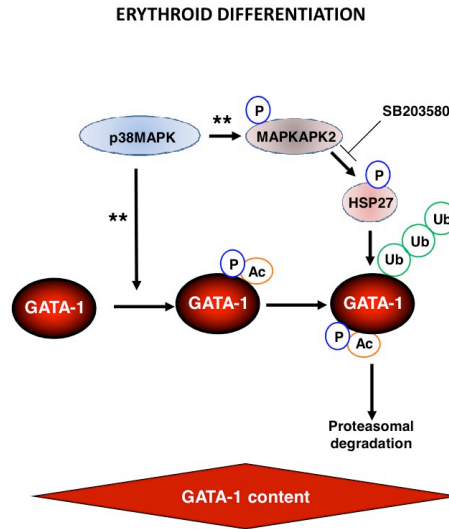
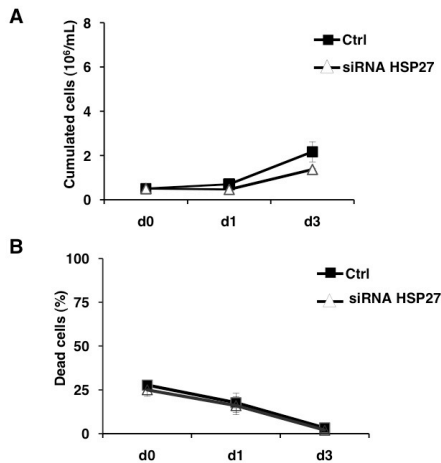


Figure 8



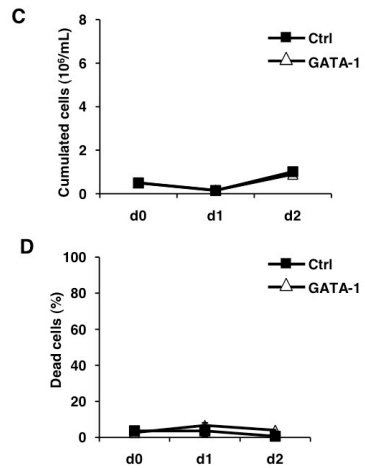
Supplementary Figure 1

HSP27 depletion do not significantly affect erythroblasts proliferation or survival



Human primary erythroblasts transfected with a siRNA specific for HSP27 (siHSP27) of a control siRNA (Ctrl) were induced to differentiate in the presence of IL3, SCF and TGFβ. At the indicated times the number of cells and cell survival was determined.

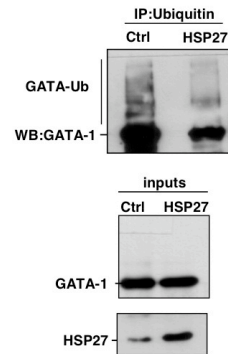
GATA-1 overexpression do not affect primary erythroblasts growth or survival.



Human primary erythroblasts, transduced with an empty lentivirus construct (Ctrl) or one encoding GATA-1 were induced to differentiate in the presence of IL3, Epo and TGFβ. At the indicated times, the number of cumulated cells and death cells were determined.

Supplementary Figure 2

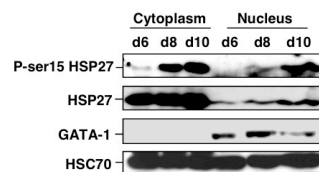
HSP27 induces ubiquitinated GATA-1 degradation in K562 differentiating cells



K562 cells were transiently transfected with HSP27 and an ubiquitin construct. The amount of ubiquitinated GATA-1 forms were determined after immunoprecipitation of ubiquitin followed by immunodetection of GATA-1.

Supplementary Figure 3

Phosphorylated HSP27 accumulates in the nucleus of differentiating human primary erythroblasts



Human CD36+ erythroblasts were induced to differentiate in the presence of IL3, and Epo and nuclear/cytosolic phosphorylated S15-HSP27, Wt-HSP27 and GATA-1 content were assessed at the indicated days by western blotting.

4.3 Conclusions article 4

Dans cette étude, nous avons mis en évidence un rôle d'Hsp27 dans la dégradation protéasomale de GATA-1 au cours de la différenciation érythroïde terminale de cellules primaires.

Hsp27 est exprimé dans les érythroblastes primaires mais aussi dans la lignée K562 et son inhibition par siRNA entraîne l'augmentation de l'expression de GATA-1 induisant le blocage de la différenciation érythroïde terminale. Il semble que le renouvellement de GATA-1 par le système du protéasome soit nécessaire mais aussi augmenté au cours de la maturation érythroïde.

Nos résultats montrent qu'Hsp27 est phosphorylée par la voie des MAPK puisque l'inhibition de la voie p38 induit une diminution de la phosphorylation de la chaperonne. Il apparaît que la forme phosphorylée d'Hsp27 augmentée au cours de la maturation terminale, entre dans le noyau des érythroblastes pour interagir avec la forme acétylée de GATA-1. Hsp27 entraîne alors l'ubiquitinylation et la dégradation protéasomique de GATA-1.

Il est connu que GATA-1 acétylé et phosphorylé est transcriptionnellement actif et que l'acétylation qui induit l'ubiquitinylation du facteur de transcription entraîne sa dégradation protéasomale. Ensemble, nos résultats indiquent qu'Hsp27 est impliqué dans ce processus de régulation d'expression de GATA-1 au cours de la différenciation érythroïde terminale. De plus, nous proposons un modèle dans lequel la voie des MAPK, connue pour jouer un rôle dans la maturation érythroïde en phosphorylant GATA-1, intervient également dans le processus de dégradation de GATA-1 par l'intermédiaire de la phosphorylation d'Hsp27.

Discussion générale

et perspectives

1 Régulation fine de GATA-1 par les protéines de choc thermique Hsp70 et Hsp27.

L'érythropoïèse un processus complexe régit entre autres par GATA-1. Le niveau d'érythroblastes produits doit être très finement régulé, il est donc crucial que le niveau d'expression de GATA-1 soit très finement contrôlé. En effet, son niveau d'activité doit être finement régulé pour une érythropoïèse normale. Il doit être élevé dans les stades précoces de la différenciation érythroïde, mais il doit être diminué pour une bonne différenciation terminale ⁴⁶ ce qui implique que la protection ainsi que la dégradation de la protéine soient des mécanismes importants pour la fonction de GATA-1. Dans ce travail, nous mettons en évidence un nouveau rôle des protéines de choc thermique Hsp70 et Hsp27 dans ce processus de régulation du niveau d'expression de GATA-1.

Il a été démontré que la régulation négative de l'érythropoïèse physiologique peut se faire par l'intermédiaire du récepteur de mort Fas et de son ligand. En effet, l'action des érythroblastes matures qui expriment le FasL sur les érythroblastes immatures qui expriment le récepteur induit l'activation des caspases provoquant la dégradation de GATA-1 par clivage ²²⁵. Parce que le niveau d'activation des caspases est lié à l'intensité de la stimulation du récepteur de mort, le degré de régulation des érythroblastes immatures est corrélé au nombre d'érythroblastes matures au sein de l'îlot érythroblastique. Cette étude montre que l'activation des caspases via le récepteur de mort induit l'arrêt de différenciation érythroïde terminale au stade d'érythroblaste basophile. Cet arrêt de différenciation est lié à la diminution du niveau de GATA-1 suite au clivage par les caspases puisque l'expression d'un mutant de GATA-1 non clivable par les caspases à la différence de GATA-1 WT, restaure la différenciation érythroïde. Cependant, l'activation des caspases est indispensable à la différenciation érythroïde terminale ²³¹. En effet, l'inhibition des caspases induit l'arrêt de maturation des progéniteurs érythroïdes au stade d'érythroblaste basophile. Lors de la différenciation érythroïde, la caspase-3 est activée de manière transitoire par la voie

mitochondriale et clive des protéines impliquées dans l'intégrité du noyau (Lamine B) et la condensation de la chromatine (Acinus). Le clivage de ces protéines induit les modifications morphologiques observées au cours de la maturation érythroblastique. Cependant il n'y a pas de mortalité cellulaire et le facteur de transcription érythroïde GATA-1 n'est pas clivé. Ainsi, le devenir des précurseurs érythroïdes est déterminé en aval de l'activation des caspases en fonction des substrats qu'elles clivent. Il semble donc qu'il y ait des mécanismes de protection sélective des substrats des caspases activées lors de l'érythropoïèse et que GATA-1 soit protégé du clivage des caspases.

Dans ce travail, nous avons mis en évidence qu'Hsp70 est une nouvelle protéine au cours de la différenciation érythroïde terminale qui par son interaction avec une de ces cibles joue un nouveau rôle anti-apoptotique majeur en empêchant le clivage de GATA-1 par la caspase-3 (figure 22).

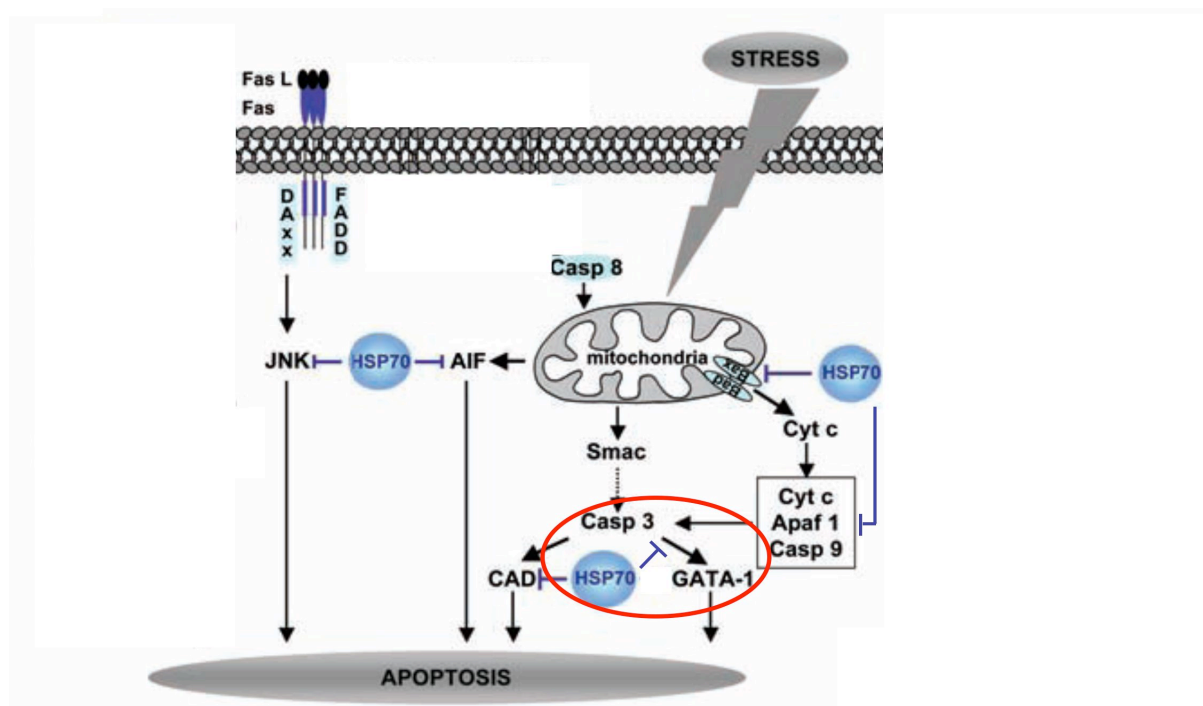


Figure 22 Nouveau rôle anti-apoptotique d'Hsp70.

(Entouré en rouge) Au cours de la différenciation érythroïde terminale, Hsp70 interagit avec GATA-1 dans le noyau des érythroblastes, le protégeant ainsi du clivage de la caspase-3 activée transitoirement au cours du processus de maturation.

La protéine Hsp70 est localisée dans le cytoplasme et le noyau où elle colocalise avec GATA-1, au cours de la différenciation érythroblastique. Au cours de l'apoptose induite par la déprivation en Epo, Hsp70 est délocalisée du noyau vers le cytoplasme permettant ainsi le clivage de GATA-1 par la caspase-3 activée. Nous proposons ainsi un modèle dans lequel, l'Epo détermine le destin des érythroblastes (apoptose versus différenciation) en aval de la

caspase-3 en régulant la localisation d'Hsp70 (cytoplasmique versus nucléaire et cytoplasmique) (Figure 23).

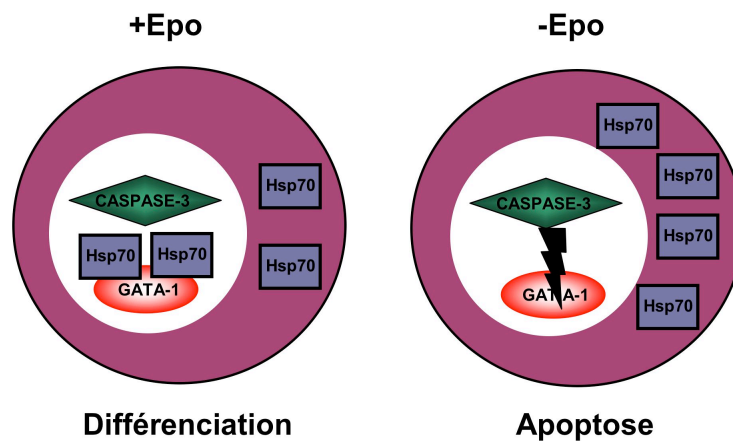


Figure 23 **Rôle d'Hsp70 dans la détermination du destin des érythroblastes sous Epo.**

Sous Epo, Hsp70 protège GATA-1 du clivage de la caspase-3 permettant la différenciation. La privation en Epo induit la délocalisation nucléaire d'Hsp70 et l'apoptose des érythroblastes dûe au clivage de GATA-1 par la caspase-3.

A l'inverse, il a été démontré que la surexpression de GATA-1 inhibe la différenciation érythroïde^{354 46}. Il est donc essentiel que GATA-1 soit dégradé lors de la phase tardive de la différenciation érythroïde. Il a été décrit que GATA-1 peut être régulé négativement par l'action de FasL sur son récepteur de mort, cependant, ce processus n'est probablement pas responsable de la diminution d'expression de GATA-1 tardive puisqu'il a lieu au stade d'érythroblaste basophile. Dans ce travail, nous avons montré qu'Hsp27 joue un rôle dans le processus de dégradation de GATA-1 par le protéasome. En effet, une fois phosphorylée par la voie des MAPK, Hsp27 migre dans le noyau des érythroblastes matures afin d'interagir avec GATA-1, induire son ubiquitinylation et l'emmener vers le protéasome. Ce travail décrit un nouveau rôle d'Hsp27 dans la différenciation érythroïde.

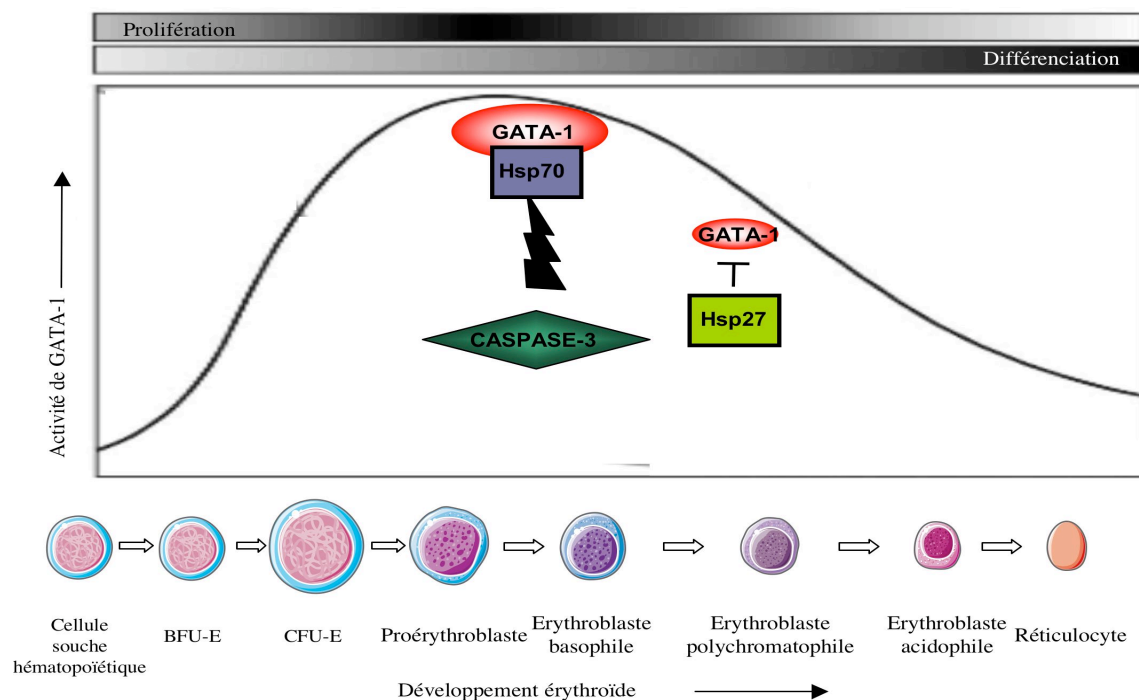


Figure 24 Modèle de la régulation dynamique de GATA-1 au cours de l'érythropoïèse.

Le niveau de GATA-1 augmente au cours de la différenciation érythroïde terminale et ce grâce à la protection d'Hsp70. GATA-1 est régulé négativement par un mécanisme faisant intervenir Hsp27 et la dégradation protéasomale. (Adapté de la revue fereirra mol cell biol 2005).

2 **Modèle de régulation de la localisation d'Hsp70 par C-Kit et REpo.**

Dans ce travail, nous montrons que la signalisation activée par c-Kit induit l'export nucléaire d'Hsp70 au stade précoce de la différenciation érythroïde, jusqu'au stade d'érythroblaste basophile. Il est probable qu'Hsp70, par son double rôle de protéine chaperonne et anti-apoptotique, soit indispensable dans le cytoplasme de ces érythroblastes. En effet, en interagissant avec la protéine pro-apoptotique bax, Hsp70 empêche sa translocation mitochondriale²⁹⁹. Il a également été décrit un rôle anti-apoptotique d'Hsp70 par l'inactivation de JNK et l'inhibition de l'apoptose dépendante de Bid²⁹⁶. Il serait intéressant de tester si Hsp70 module ces protéines pro-apoptotiques dans les progéniteurs érythroïdes, ce qui empêcherait peut-être une activation de la caspase-3 trop précoce.

Il nous reste à démontrer que l'expression prolongée de c-Kit induit le blocage de la différenciation érythroïde terminale et l'apoptose des progéniteurs érythroïdes par la perte de protection de GATA-1 et ce, au stade d'activation de la caspase-3 dans les érythroblastes normaux. Ce modèle permettrait d'expliquer le phénotype qu'on observe chez certains patients atteints de SMD où il a été décrit une surexpression de c-Kit³³². Confortant nos

résultats, il a été décrit qu'au cours de la phase précoce de la maturation érythroïde terminale, c-Kit agit sur la prolifération en retardant la différenciation⁷⁸ et que l'expression prolongée de c-Kit entraîne un défaut de la maturation érythroïde³⁵⁵. Il est donc indispensable que l'expression de c-Kit soit diminuée au cours de la différenciation terminale afin de permettre à Hsp70 de s'accumuler dans le noyau des érythroblastes et de jouer son rôle de chaperonne pour GATA-1 au moment où la caspase-3 est active.

De plus, nous avons observé que la diminution d'expression de c-Kit ou que l'inhibition précoce de la voie PI3-K/AKT sont concomitantes à l'activation de la caspase-3. Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de la signalisation induite par c-Kit sur l'activation de la caspase-3. En effet, si la diminution d'expression de c-Kit est en partie responsable de l'activation de la caspase-3, ceci permettrait une réelle synchronisation entre l'induction de la différenciation par la caspase-3 activée et la protection de GATA-1 par Hsp70 nucléaire, toutes deux indispensables à la maturation érythroïde terminale.

D'autre part, au cours de ce travail de thèse, nous avons démontré que le REpo permet la localisation nucléaire d'Hsp70 et la protection de GATA-1 au stade d'activation des caspases. Nous suggérons que la voie Lyn induite par l'Epo soit impliquée dans la rétention nucléaire d'Hsp70 permettant aux érythroblastes de se différencier. D'autres études montrent que la voie Lyn est majeure pour la différenciation érythroïde terminale. Récemment il a été décrit un rôle essentiel de Lyn induit par l'Epo dans la régulation négative de c-Kit ce qui limite la coopération entre le SCF et l'Epo pour la prolifération et la survie des proérythroblastes et rend les progéniteurs strictement dépendants de l'Epo¹⁴⁹. Par ailleurs, il a été décrit que GATA-1 induit également la répression de c-Kit et d'AKT³⁵⁵. Nos résultats suggèrent qu'Hsp70 pourrait être le lien entre ces deux modèles d'inhibition de c-Kit. En effet, l'Epo, en activant Lyn, permettrait à Hsp70 de protéger GATA-1 qui va inhiber l'expression de c-Kit (figure 25).

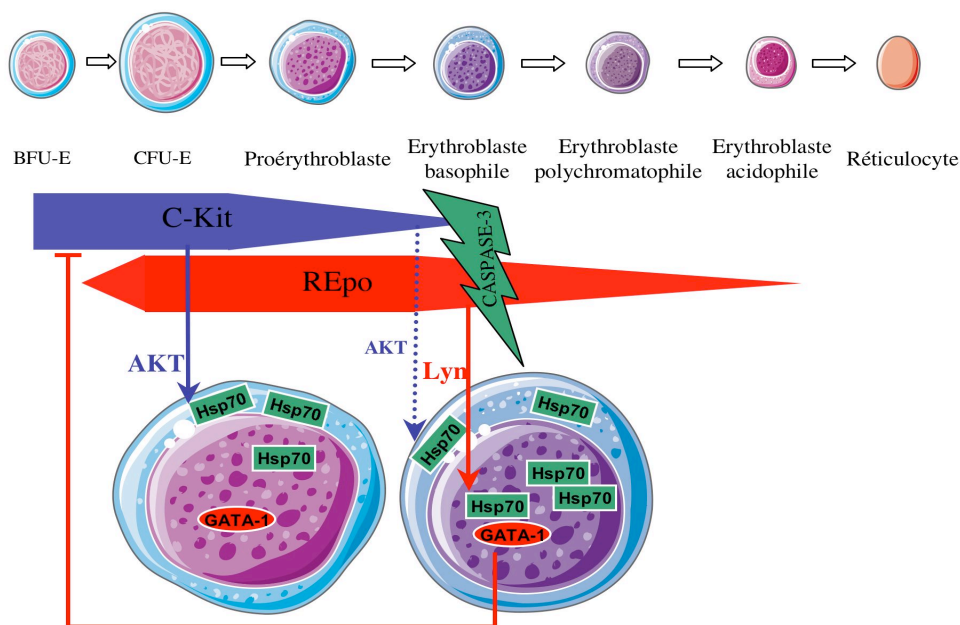


Figure 25 Effets de c-Kit et du REpo sur la localisation d'Hsp70.

Dans un premier temps, c-Kit en activant AKT induit l'export nucléaire d'Hsp70 (flèche bleue pleine). Puis, lors de l'inhibition de l'expression de c-Kit, l'export nucléaire d'Hsp70 par AKT est diminué (flèche bleue pointillée). Dans le même temps, l'Epo induit Lyn qui inhibe également l'export nucléaire d'Hsp70 et la protection de GATA-1 du clivage par la caspase-3 activée au stade d'érythroblaste basophile. GATA-1 inhibe l'expression de c-Kit et AKT (flèches rouges).

3 Implications dans des pathologies érythroïdes

3.1 Syndromes myélodysplasiques

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont un exemple de maladie dans laquelle la dérégulation de l'apoptose est responsable de manifestations hématologiques. Les SMD sont des anomalies clonales de l'hématopoïèse qui se traduisent par une anémie, une neutropénie et une thrombocytopénie mais la caractéristique particulière est la maturation anormale (dysplasie) des trois lignages, généralement avec une hypercellularité de la moelle osseuse et une augmentation de l'apoptose³⁵⁶. Les SMD évoluent souvent vers une leucémie aigüe myéloïde (LAM), mais la mort des patients peut aussi être la conséquence d'un défaut de la moelle sans transformation leucémique. Deux tiers environ des patients ont une anémie au diagnostic et presque tous vont en développer une au cours de l'évolution, rendant nécessaire de multiples transfusions. L'anémie affecte la qualité de vie des patients.

Un outil pronostic, le score IPPS (pour *International Pronostic Score System*), a été établi sur l'analyse de 800 patients³⁵⁷ et permet la définition de trois critères de pronostics

efficaces pour la survie et le risque de transformation leucémique. Ces critères sont le pourcentage de blastes médullaires, la cytogénétique de la moelle osseuse et le nombre de cytopénies du sang périphérique. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au SMD de bas grade, caractérisé par moins de 5% de blastes médullaires et un karyotype bon ³⁵⁷.

Le haut niveau d'apoptose est responsable du défaut d'érythropoïèse observé dans les SMD ³⁵⁸. Cette augmentation du taux d'apoptose est typique des stades précoces et intermédiaires du développement de la maladie. Une augmentation de la sensibilité à l'apoptose est remplacée par une augmentation de la résistance à l'apoptose au cours de la phase de progression de la maladie en leucémie ³⁵⁹. L'augmentation de l'apoptose dans les précurseurs de la moelle osseuse est une caractéristique observée chez la majorité de patients atteints de SMD ³⁶⁰. L'analyse des mécanismes impliqués montre une implication des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. Plusieurs études montrent que l'activation de la voie Fas/FasL est un mécanisme pathogénique important du SMD ^{361,362,363}. En effet, l'expression de Fas est élevée au cours de la différenciation érythroïde chez les patients atteints de SMD ^{364,365}. L'expression de FADD (*Fas-associated death domain*) est aussi élevée au cours du stade précoce de la différenciation érythroïde et l'expression d'une forme dominant négatif de FADD inhibe l'activité de la caspase-8 et la mort cellulaire mais restaure aussi la croissance des BFU-E sans effet sur la différenciation ³⁶⁶. De plus, dans les érythroblastes matures, l'expression de FasL est également augmentée chez les patients atteints de SMD ³⁶⁷. Ces résultats montrent que les érythroblastes de SMD présentent une exacerbation du mécanisme physiologique du contrôle de l'érythropoïèse médié par Fas et une apoptose dépendante de Fas, même lors de la présence de hauts taux d'Epo. Outre la dérégulation de la voie extrinsèque de l'apoptose, la voie intrinsèque est aussi observée avec relargage du cytochrome c de la mitochondrie et activation de la caspase-9 ³⁶⁸.

La régulation négative de GATA-1 empêche la survie à long terme des cellules érythroïdes, indiquant que ce mécanisme peut être impliqué dans des dysérythropoïèses dans lesquelles la stimulation de récepteur de mort est prolongée ou la voie intrinsèque de l'apoptose est activée, comme dans le syndrome myélodysplasique ³⁶⁹. Des résultats préliminaires de l'équipe du professeur Fontenay montrent en effet que de manière concomitante avec l'activation des caspases, l'expression de GATA-1 est diminuée malgré la présence de cytokines chez les patients atteints de SMD. L'addition d'un inhibiteur des caspases restaure l'expression de GATA-1 suggérant que la diminution d'expression de GATA-1 est dépendante du clivage par les caspases. L'expression ectopique de GATA-1 muté

pour le site de clivage par les caspases protège les progéniteurs érythroïdes de patients de l'apoptose et permet leur différenciation (résultats non montrés).

Dans ce travail de thèse, nous avons mis en évidence que le défaut de localisation nucléaire d'Hsp70 lié à l'expression prolongée de c-Kit est en partie responsable de clivage de GATA-1 par les caspases chez les patients de SMD de bas grade en général. Il a été démontré que le mécanisme de transformation leucémique de progéniteurs érythroïdes de SMD est un processus à plusieurs étapes ³⁷⁰. Actuellement, des anomalies d'oncogènes ou de gènes associés à des tyrosines kinases tels que p53, ras, FMS et FLT3 peuvent contribuer au défaut hématopoïétique qui caractérise l'évolution clonale du SMD vers la LAM ^{371,372,373,374}. De plus, des mutations du gène Kit au stade avancé de SMD particulièrement au codon 816 peuvent être un événement additionnel qui contribue à la progression du SMD vers la LAM ³⁷⁵. Nous proposons donc que l'expression prolongée de c-Kit responsable de la délocalisation nucléaire d'Hsp70 et du clivage de GATA-1 soit un événement précoce du SMD, dans un second temps, une mutation du gène de c-Kit pourrait participer à leucémogénèse.

La modulation de la signalisation impliquée dans la localisation subcellulaire d'Hsp70 pourrait être envisagée comme alternative thérapeutique. Il serait intéressant de tester si le Glivec, un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de c-Kit, pourrait restaurer la survie et la différenciation érythroïde chez des patients de SDM dont l'expression de c-Kit est augmentée.

Il serait également intéressant de vérifier si le statut de phosphorylation et la localisation d'Hsp27 ainsi que l'activation de la voie des MAPK sont dérégulés chez les patients atteints de SMD puisque nous avons montré qu'Hsp27 participe à la dégradation de GATA-1.

Récemment, il a été démontré que la perte partielle et la diminution d'expression du gène RPS14 sont responsables des SMD 5q- ³⁷⁶. Ce gène code pour une protéine importante pour la biogénèse ribosomale. L'équipe de Golub a montré que l'inhibition de RPS14 inhibe la différenciation érythroïde et induit l'apoptose des érythroblastes. Le mécanisme de dysgénèse ribosomale menant à l'anémie reste inconnu. Le phénotype observé est identique à celui que nous avons mis en évidence lors de l'inhibition de l'expression d'Hsp70 dans les érythroblastes normaux. Des résultats préliminaires montrent, sur des érythroblastes normaux, que l'inhibition de la protéine RPS14 par siRNA induit la diminution d'expression d'Hsp70, ce qui pourrait expliquer le phénotype observé chez les patients. Il reste à démontrer le mécanisme par lequel RPS14 induit la diminution d'expression d'Hsp70.

3.2 Polyglobulie de Vaquez

La polyglobulie de Vaquez ou Polycythaemia vera (PV) est un désordre myéloprolifératif clonal initié dans une cellule souche hématopoïétique, caractérisé par la surproduction de cellules érythroïdes souvent accompagnée de thrombocytose et/ou granulocytose^{377,378}. Puisque l'accumulation de globules rouges est dominante dans le phénotype clinique, la maladie a donc été appelée polycythémie. Les progéniteurs érythroïdes de patients atteints de PV forment des colonies érythroïdes (EEC pour *endogenous erythroid colonies*) spontanées en culture même sans Epo³⁷⁹. Les EEC peuvent être présentes aussi dans des cas de thrombocytémie essentielle (TE) et de myélofibrose idiopathique (MFI)³⁸⁰.

Bien que la croissance soit indépendante de l'Epo, la séquence, l'expression et l'affinité de liaison de l'Epo au REpo sont normales chez les patients de PV^{381,382,383,384}. De plus, les progéniteurs de patients sont hypersensibles à l'Epo mais aussi à l'IGF-1, l'IL-3, le GM-CSF et au SCF^{385,386,387,388}. Ces résultats suggèrent qu'un événement en aval du récepteur soit responsable de la formation d'EEC. Plusieurs études démontrent que la mutation V617F de JAK2 est liée à la majorité des PV (89%) mais aussi dans des cas d'TE (43%) et MFI (43%)^{350,389,390,391,392}. La mutation induit une activation constitutive de la tyrosine kinase en empêchant la régulation négative du domaine JH2 de JAK2. JAK2 muté peut se lier au récepteur puis recruter et phosphoryler STAT5 en l'absence de facteur de croissance. La mutation est aussi nécessaire pour l'hypersensibilité à l'Epo des progéniteurs érythroïdes et la formation d'EEC en culture *in vitro*³⁵⁰. La mutation de JAK2 est directement liée au phénotype de PV puisque l'expression rétrovirale de la protéine mutée induit un phénotype d'érythrocytose³⁵⁰. Une duplication de l'allèle muté, induisant une perte du second allèle JAK2 sauvage agissant probablement comme un dominant négatif, permet un avantage prolifératif et la croissance du clone homozygote³⁹⁰. Récemment, une étude a montré qu'un défaut de TET2 est présent dans les cellules souches hématopoïétiques et précède la mutation V617F de JAK2 chez des patients atteints de désordre myéloprolifératif, mais est aussi présent chez des patients atteints de SMD ou LAM secondaire³⁹³.

Les progéniteurs érythroïdes de PV sont résistants à des stimuli apoptotiques³⁹⁴ et l'expression de Bcl-X_L est augmentée³⁹⁵. La surexpression de Bcl-X_L peut expliquer la différenciation des progéniteurs érythroïdes *in vitro* en l'absence d'Epo ainsi que l'avantage de survie *in vivo* à de faibles productions d'Epo. Il semble que les voies JAK/STAT, PI3-K et des Src kinases soient impliquées dans la différenciation érythroïde indépendante d'Epo³⁵¹. D'autre part, les progéniteurs érythroïdes de PV mutés pour JAK2 activent moins les caspases

et le clivage de GATA-1 est incomplet en réponse à la stimulation de Fas. En effet, il a été démontré que l'expression de c-FLIP_{court} (*cellular FLICE-inhibitory protein*), un homologue inactif de la caspase-8 qui inhibe l'apoptose induite par le récepteur de mort, est diminuée chez ces patients³⁹⁶.

Nos résultats préliminaires montrent que, même en l'absence d'Epo, Hsp70 reste localisée dans le noyau dans des progéniteurs érythroïdes de patients atteints de PV. Il reste à tester si l'inhibition d'Hsp70 induit l'apoptose des érythroblastes mutés pour JAK2. De façon intéressante des érythroblastes de patients atteints de maladie de Vaquez mais non mutés pour JAK2 présentent également une rétention d'Hsp70 dans le noyau et une absence de clivage de GATA-1. Il serait donc intéressant de tester si les mécanismes de rétention d'Hsp70 retrouvés dans les érythroblastes normaux, tel que l'activation de Lyn, ne sont pas actifs de façon constitutive, mais aussi de vérifier si les séquences des gènes d'Hsp70 ou de Lyn sont normales chez ces patients.

Annexe 1

Journal de la Société de Biologie, 199 (3), 219-231 (2005)

L'érythropoïèse : un paradigme pour l'étude du rôle des caspases dans la mort et la différenciation cellulaire

par J. A. Ribeil, Y. Zermati, J. Vandekerckhove, M. Dussiot, J. Kersual & O. Hermine

CNRS UMR 8147 et Département d'Hématologie, Faculté de Médecine et Université René Descartes Paris V, Hôpital Necker, France, 75743 Cedex 15.

Correspondant : Olivier Hermine. Tél. :01 44 49 53 86. Fax :01 44 49 06 76. E-mail : hermine@necker.fr

Reçu le 12 mai 2005

RÉSUMÉ

La différenciation érythroïde est sous la dépendance du facteur de transcription GATA-1 qui régule l'expression des gènes érythroïdes (hémoglobine, glycophorine, récepteur à l'érythropoïétine) et de l'érythropoïétine. La différenciation érythroïde terminale est caractérisée par des modifications morphologiques comprenant une réduction progressive du volume cellulaire et du noyau associée à une condensation marquée de la chromatine. Les changements morphologiques sont en partie comparables à ceux qui sont observés au cours de l'apoptose. La production de globules rouges dépend du taux d'apoptose des progéniteurs et des précurseurs érythroïdes. La privation en érythropoïétine ou l'induction de la voie Fas aboutissent à l'activation de la caspase-3, ce qui a pour conséquence la protéolyse de GATA-1, l'arrêt de maturation et l'apoptose des érythroblastes immatures. Récemment nous avons mis en évidence qu'en

présence d'érythropoïétine, l'activation de la caspase-3 est également indispensable aux modifications morphologiques caractéristiques observées au cours de la différenciation érythroïde terminale chez l'Homme. Les protéines clivées par les caspases, lors de l'érythropoïèse, comprennent la Lamine B et Acinus impliquées dans la condensation de la chromatine. Par contre, alors que la caspase-3 est activée, le clivage de GATA-1 et l'apoptose ne sont pas observées. Ainsi, le devenir des précurseurs érythroïdes est déterminé en aval de l'activation des caspases en fonction des substrats qu'elles clivent. Il semble donc qu'existent lors de l'érythropoïèse, des mécanismes de protection sélective des substrats vis à vis des caspases activées. Cette nouvelle fonction des caspases que nous décrivons dans cette revue pourrait jouer un rôle dans d'autres systèmes hématopoïétiques et non hématopoïétiques.

SUMMARY Erythropoiesis: a paradigm for the role of caspases in cell death and differentiation

Erythroid differentiation involves the transcription factor GATA-1 that positively regulates promoters of erythroid genes (including haemoglobin, glycophorin, erythropoietin receptor) and of erythropoietin. Terminal erythroid differentiation is characterized by major morphological changes that include chromatin condensation and cell size reduction. The morphological changes are partially similar at least to those observed during apoptosis. The production of red cells depends on the apoptosis rate of erythroid progenitors and precursors. Upon erythropoietin starvation or engagement of the death receptor Fas, caspases are activated in erythroid precursors and cleave GATA-1, thus inducing maturation arrest and apoptosis of immature erythroblasts. We have recently demonstrated that, upon erythropoietin sti-

mulation, caspase-3 was also activated, an event required for human terminal erythroblast maturation. Proteins cleaved by caspases in erythroid cells undergoing terminal differentiation include Lamin B and Acinus, which are involved in chromatin condensation. In contrast, despite caspase-3 activation neither GATA-1 degradation nor apoptosis was observed. Thus, the fate of erythroid precursors is determined downstream of caspase activation by the pattern of cleaved targets. Therefore, there are some mechanisms underlying the selective protection of caspase-3 targets during erythropoiesis. This model in which caspases activation is required for differentiation may apply to other haematopoietic or non haematopoietic cellular systems which are described in this review.

Article available at <http://www.biologie-journal.org> or <http://dx.doi.org/10.1051/jbio:2005023>

INTRODUCTION

L'érythropoïèse est un processus complexe qui aboutit à la formation de 100.10^9 globules rouges par jour. Elle a lieu chez l'adulte dans la moelle osseuse. La production de globules rouges dépend du taux d'apoptose des progéniteurs et des précurseurs érythroïdes. Elle est finement régulée pour permettre d'adapter la production aux besoins en oxygène des tissus périphériques. Récemment nous avons mis en évidence que l'activation d'une enzyme impliquée lors de l'apoptose, la caspase-3, est également indispensable aux modifications morphologiques caractéristiques observées au cours de la différenciation érythroïde terminale chez l'Homme (Zermati *et al.*, 2001). Dans ce contexte de différenciation, bien que la caspase-3 soit activée, il n'y a ni apoptose ni clivage du facteur de transcription GATA-1 qui est indispensable à la différenciation érythroïde terminale. L'objet de cette revue est de discuter, à travers le modèle de différenciation érythroïde terminale, les mécanismes physiologiques de différenciation cellulaire faisant intervenir les caspases.

L'ÉRYTHROPOÏÈSE : GÉNÉRALITÉS

Les érythrocytes de l'homme adulte normal proviennent d'une cellule souche hématopoïétique présomptive. Celle-ci va s'engager dans une voie de différenciation myéloïde, vers un progéniteur multipotent. Ce progéniteur appelé CFU-GEMM (pour Colony Forming Unit Granulocyte/Erythrocyte/Mégacaryocyte/Macrophage) va ensuite se différencier en un progéniteur restreint à la voie érythroïde appelé BFU-E (pour Burst Forming Unit Erythroid). Le BFU-E va proliférer et se différencier par étapes successives pour aboutir à la formation de précurseurs érythroblastiques morphologiquement reconnaissables au niveau médullaire (proérythroblastes et érythroblastes) et de globules rouges matures dans le sang circulant en environ trois semaines chez l'Homme (Gregory *et al.*, 1978) (Fig. 1). L'engagement des progéniteurs multipotents vers la voie érythroïde semble s'effectuer grâce à une combinaison d'expression de facteurs de transcription et en particulier du facteur GATA-1 qui permet la régulation positive des promoteurs des gènes érythroïdes comme la glycophorine A, l'hémoglobine, et le récepteur à l'éry-

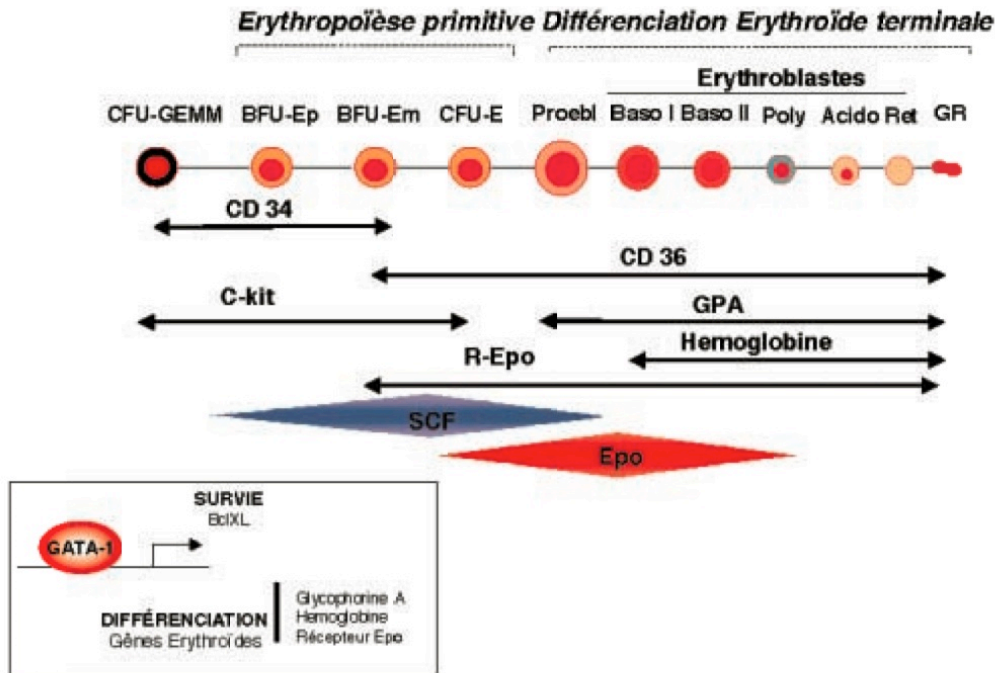


FIG. 1. —Schéma de l'érythropoïèse.

a) Antigène de différenciation, expression des deux principaux récepteurs régulateurs de l'érythropoïèse (c-kit, R-EPO). Niveaux d'action du Stem Cell Factor (SCF) et de l'érythropoïétine (EPO).

b) Gènes régulés par GATA-1 (Différenciation et survie).

thropoïétine. En son absence, la production de globules rouges est impossible. Des expériences sur des cellules souches embryonnaires (ES) invalidées pour le gène de GATA-1 ont montré que, dans les phases précoces, la protéine GATA-1 pouvait être remplacée par d'autres facteurs de transcription de la famille GATA tel que GATA-2 (Cantor *et al.*, 2002). Par contre, GATA-1 est absolument nécessaire dans les phases tardives de l'érythropoïèse, car cette protéine régule progressivement l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L (Fig. 1). Les différents progéniteurs érythroïdes ont été définis grâce à leurs caractéristiques de culture en milieux semi-solides. Les progéniteurs BFU-E vont donner de grosses colonies érythroïdes contenant plusieurs centaines de milliers d'érythroblastes matures, après vingt et un jours de culture chez l'Homme. Les progéniteurs plus avancés dans leur différenciation comme les BFU-E matures vont donner des colonies de plus petite taille en quatorze jours, alors que les CFU-E qui sont les progéniteurs les plus matures vont donner des colonies d'environ 30 à 60 érythrocytes en moins d'une semaine. Grâce à ces techniques en milieux semi-solides, les caractéristiques immunophénotypiques et les besoins en facteurs de croissance de ces différents progéniteurs ont pu être déterminés. Les progéniteurs les plus précoces expriment l'antigène CD34, et le récepteur au stem cell factor, c-kit. A partir du stade BFU-E, le récepteur à l'érythro-

poïétine commence à être exprimé avec un maximum d'expression au niveau des CFU-E. Les antigènes érythroïdes spécifiques, comme les antigènes des groupes sanguins, s'expriment au niveau des CFU-E ainsi que la glycophorine A. D'autres marqueurs non spécifiques permettent d'identifier ces progéniteurs comme par exemple le récepteur à la transferrine fortement exprimé à partir des BFU-E et l'antigène CD36 (également présent sur les mégacaryocytes et les monocytes matures) (Gregory *et al.*, 1978). De même, les facteurs de croissance nécessaires au développement de ces différents progéniteurs ont pu être déterminés. Pour la régulation positive, deux facteurs semblent être indispensables, le stem cell factor (SCF) pour les phases précoces jusqu'au stade CFU-E et l'érythropoïétine (Epo) à partir des BFU-E tardifs jusqu'au stade des érythroblastes (Koury *et al.*, 2002).

CYTOKINES RÉGULANT POSITIVEMENT L'ÉRYTHROPOÏÈSE

Stem Cell Factor

Le SCF est fabriqué par les cellules stromales de la moelle osseuse. Il existe sous une forme soluble et une forme trans-membranaire qui semble être prédominante

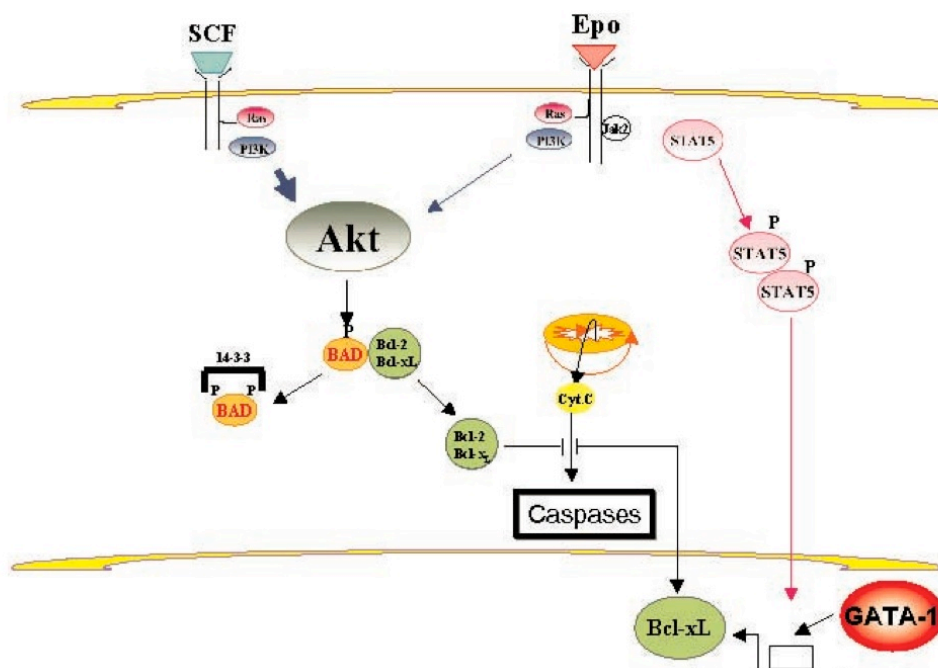


FIG. 2. – Synergie entre EPO et SCF pour la survie cellulaire.

pour la régulation de l'érythropoïèse puisque les souris n'exprimant que la forme soluble sont anémiques. Le SCF agit sur son récepteur c-kit, qui est un récepteur à tyrosine kinase, et va induire des signaux intracellulaires essentiellement de survie et de prolifération pour les progéniteurs érythroïdes. Il agit en synergie avec d'autres facteurs pour la prolifération, notamment avec le GM-CSF et l'interleukine 3. Il pourrait également augmenter la sensibilité des CFU-E à l'Epo. L'activation de la PI3-kinase par c-kit est sans doute une des voies principales pour augmenter la prolifération et la survie, par l'intermédiaire de la phosphorylation de la protéine AKT (voir plus loin) (Fig. 2). Actuellement, il n'y a aucun argument démontrant l'existence d'une régulation de la production de SCF en fonction de l'hypoxie tissulaire ou, à l'inverse, en fonction de l'hyperproduction de globules rouges. Son expression semble constitutive.

Érythropoïétine

L'érythropoïétine (EPO) est le facteur régulateur principal de l'érythropoïèse. Elle est produite par le rein et va agir au niveau de la moelle osseuse pour stimuler la production des globules rouges. Cette production de glo-

bules rouges va apporter de l'oxygène dans les cellules rénales qui vont alors diminuer leur synthèse d'EPO, ce qui aura pour conséquence la diminution en retour de la production de globules rouges. Il existe donc à ce niveau une véritable régulation endocrine, le rein étant la « glande » productrice et la moelle osseuse l'organe cible (Fig. 3). Ainsi physiologiquement on a pu retrouver une parfaite corrélation entre le taux d'hémoglobine et le taux d'EPO. Pour un taux d'hémoglobine normal d'environ 12 g/dl, le taux d'EPO circulante est d'environ 20 unités/l. Ce dernier va augmenter en fonction de la baisse du taux d'hémoglobine pour atteindre environ 200 unités/l, lorsque l'hémoglobine atteint 7 g/dl. Cette production est altérée de façon significative au cours de nombreuses pathologies à l'origine d'une anémie.

Régulation de la synthèse d'EPO par les cellules rénales

L'EPO est donc une hormone circulante qui gouverne la production de globules rouges. En réponse à l'anémie ou l'hypoxie, les taux circulants peuvent augmenter jusqu'à 1 000 fois. La régulation de la production d'EPO est donc cruciale. De nombreux travaux ont contribué à

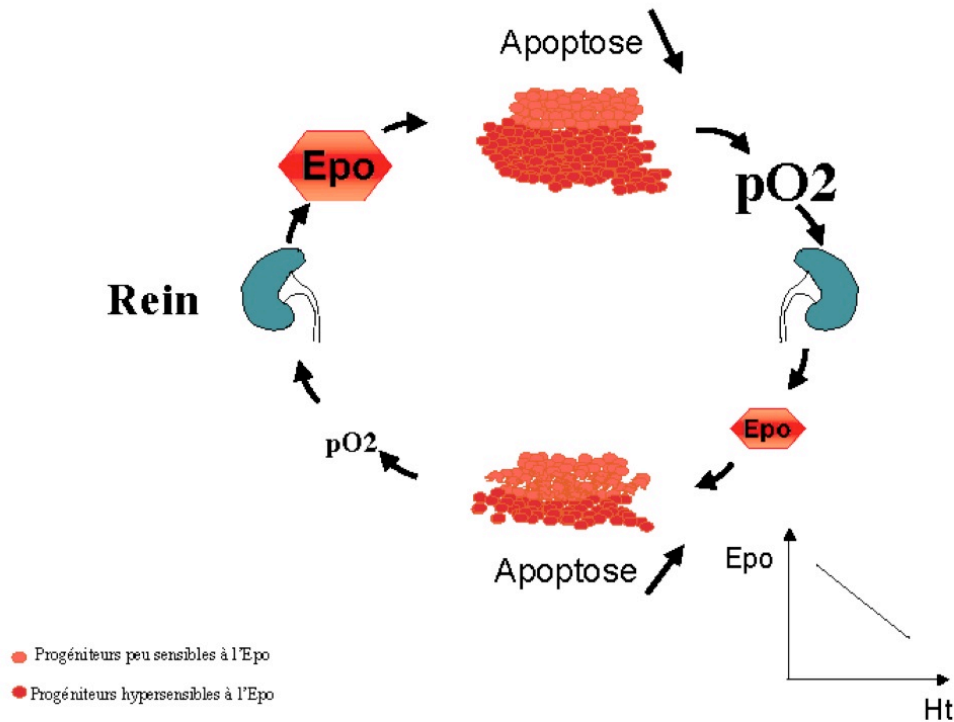


FIG. 3. – Régulation endocrine de l'érythropoïèse.

montrer que le rein est le principal lieu de production de l'EPO chez l'adulte. L'absence de réponse à l'anémie chez le sujet nephrectomisé en est la preuve par excellence. En plus du rein, le foie est capable de produire de l'EPO chez l'adulte, les cellules impliquées étant les hépatocytes et les cellules de Ito. Les mécanismes responsables de la sensibilité des cellules à l'hypoxie commencent à être mieux compris. Une somme considérable de travaux des dernières années a établi un rôle majeur pour les facteurs de transcription HIF (*Hypoxia inducible Factor*) dans cette fonction et ont fait l'objet de revues récentes (Brahimi-Horn *et al.*, 2005).

Mécanismes moléculaires de l'action de l'EPO au niveau des érythroblastes

Au niveau médullaire, l'EPO agit sur son récepteur situé sur les BFU-E et les CFU-E (Gregory *et al.*, 1978; Koury *et al.*, 2002). L'homodimérisation des récepteurs de l'EPO va aboutir au recrutement des protéines à activité tyrosine kinase telles que JAK2 qui vont alors phosphoryler en retour le récepteur et ses substrats. Il semble bien établi que les voies activées par le récepteur de l'EPO permettent la prolifération et la survie des cellules par l'intermédiaire de l'activation de la PI 3-Kinase, et sans doute des MAP kinases. Le récepteur à l'EPO activé recrute également les protéines STAT et en particulier STAT5A et STAT5B, qui vont être phosphorylées par la protéine JAK2. Ces protéines STAT5 une fois phosphorylées vont s'hétérodimériser, puis migrer dans le noyau pour augmenter l'expression de certains gènes. Actuellement, il n'y a pas de gène de différenciation érythroïde spécifiquement induit par STAT5. Par contre, STAT5 agit en synergie avec GATA1 pour augmenter l'expression de Bcl-x_L, augmentant ainsi la survie cellulaire (Fig. 2). Ainsi il semble que l'action principale de l'EPO soit d'augmenter la survie des progéniteurs érythroïdes (Koury *et al.*, 1990). Le modèle proposé actuellement est un modèle où les progéniteurs érythroïdes tardifs, essentiellement les CFU-E, auraient un seuil de sensibilité à l'EPO variable. Certains de ces progéniteurs seraient très sensibles à l'EPO et pourraient donc survivre en présence de faibles taux d'EPO, d'autres au contraire seraient très peu sensibles et nécessiteraient des taux élevés d'EPO pour survivre (Fig. 3). Les mécanismes définissant les niveaux de sensibilité de ces progéniteurs ne sont pas connus. On sait qu'ils ne sont pas liés à une variation du nombre de récepteurs ni à une variation de leur affinité. Ce modèle permettrait de rendre compte de la synergie existant entre le SCF et l'Epo. Le SCF, en activant fortement la PI 3-kinase, permettrait la phosphorylation d'AKT qui elle-même phosphorylerait des protéines telles que BAD, permettant ainsi la libération de la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L. De son côté l'EPO, en activant STAT5, permettrait d'augmenter l'expression de Bcl-x_L (Fig. 2). Ce schéma est sans doute trop simpliste et d'autres mécanismes moléculaires en jeu restent encore à découvrir.

La régulation positive de l'érythropoïèse se ferait essentiellement par inhibition de l'apoptose des progé-

niteurs et des précurseurs érythroïdes par l'intermédiaire de la modulation de la protéine Bcl-x_L. La prolifération et la différenciation s'effectueraient ensuite de façon non régulable une fois assurée la survie des progéniteurs. Il ne semble pas que le récepteur de l'EPO puisse envoyer des signaux spécifiques de différenciation. En effet, si l'on remplace les récepteurs de l'EPO par d'autres récepteurs de cytokines spécifiques d'autres lignages (G-CSF, Thrombopoïétine, Prolactine), la différenciation s'effectue normalement à partir du moment où la survie est possible.

RÔLE DES CASPASES DANS L'ÉRYTHROPOÏÈSE

Rôle des caspases dans la régulation négative de l'érythropoïèse

Pour éviter une trop forte production de globules rouges, l'érythropoïèse doit être régulée de façon négative. Cette régulation négative s'effectue essentiellement par le taux d'EPO circulante comme nous venons de l'expliquer. Plus récemment, il a été démontré que la régulation négative de l'érythropoïèse s'effectue par un mécanisme paracrine faisant jouer les récepteurs de mort tels que Fas. Dans ce modèle, il a été proposé que les érythroblastes en fin de différenciation (érythroblastes polychromatophiles et acidophiles) expriment Fas-Ligand et qu'au niveau de la moelle osseuse, au sein des îlots érythroblastiques composés d'un macrophage entouré d'érythroblastes à tous les stades de maturation, ils interagiraient directement avec les progéniteurs et les précurseurs érythroblastiques plus précoces exprimant le récepteur Fas pour induire l'arrêt de la maturation et l'apoptose. Ainsi le taux d'érythroblastes matures dans la moelle pourrait contrôler rétroactivement l'érythropoïèse en induisant l'apoptose des précurseurs érythroblastiques (De Maria *et al.*, 1999).

Pour rappel (Fig. 4), Fas-Ligand, en agissant sur son récepteur Fas, induit le recrutement de caspases, essentiellement la caspase-8 qui, elle-même, va activer en retour la caspase-3 pour induire le clivage des protéines nécessaires à la structure et à l'intégrité du noyau et de la chromatine. Cette activation de la caspase-3 va ainsi conduire à l'apoptose. De plus, l'activation de la caspase-8 clive et active la protéine Bid qui permet alors la dépoliarisation de la membrane mitochondriale. Une fois dépoliarisée, la mitochondrie va libérer du cytochrome c dans le cytoplasme, ce qui aboutit à la formation de l'apoptosome comprenant la pro-caspase-9 et le facteur Apaf-1. L'apoptosome va induire l'activation de la caspase-9 qui va cliver la caspase-3 et conduire également à l'apoptose par cette voie mitochondriale. Cette deuxième voie d'apoptose peut être inhibée par de forts taux de la protéine Bcl-x_L qui empêche la dépoliarisation de la mitochondrie. Au niveau de l'érythropoïèse, la protéine GATA-1 est une des cibles de la caspase-3. Son clivage va induire un arrêt de l'expression des gènes nécessaires à la maturation et induire ainsi un blocage de la différenciation érythroïde. De plus, le clivage de GATA-1 va

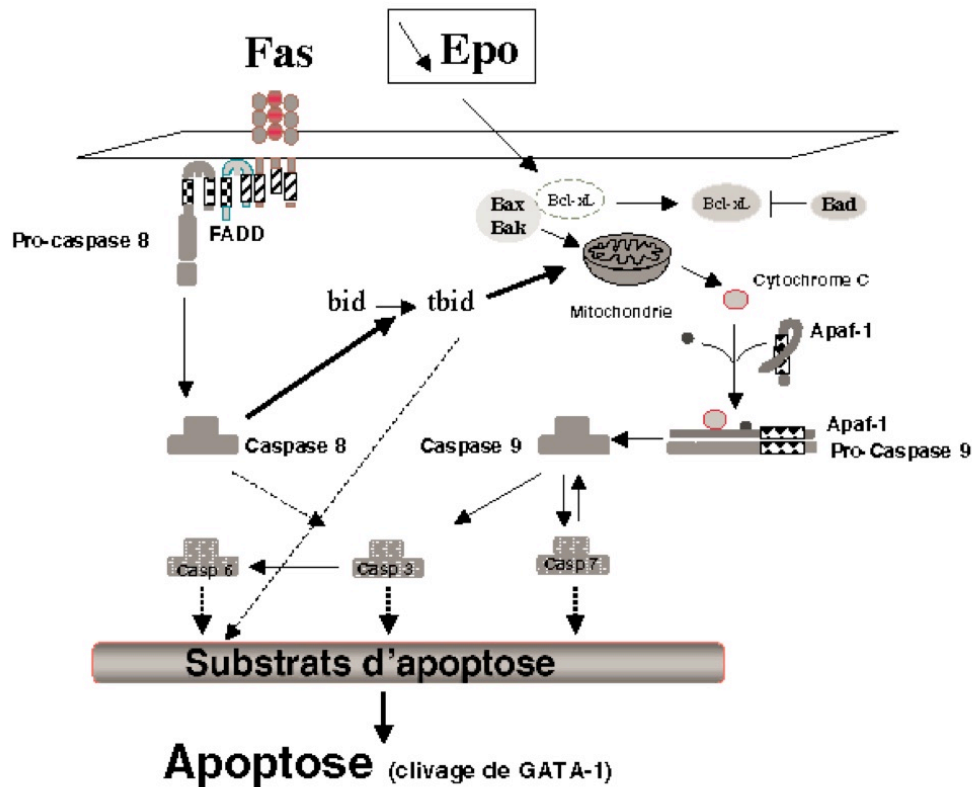


FIG. 4. – Mécanismes d'activation des caspases en l'absence d'EPO, ou en présence de Fas.

conduire à une diminution de l'activité du promoteur du gène de Bcl-x_L (De Maria *et al.*, 1999). Dans ce modèle faisant intervenir Fas/Fas-ligand, l'EPO pourrait agir en bloquant les effets apoptotiques de Fas-ligand. En effet, en augmentant les taux de Bcl-x_L, elle permettrait de bloquer la dépolarisation de la mitochondrie induite par Bid et ainsi de diminuer l'activation de la caspase-9 et de la caspase-3 et finalement de l'apoptose (Kroemer *et al.*, 1998). Dans ce modèle, il faut donc considérer que l'activation de la caspase-3, qui fait suite à l'activation de Fas, passe essentiellement par la voie mitochondriale (comme dans les hépatocytes) plutôt que directement par la voie de la caspase-8 (Fig. 4). Ainsi les caspases sont les enzymes clés de la régulation négative de l'érythropoïèse.

Rôle des caspases dans la maturation terminale des érythroblastes

Plusieurs observations indiquent que l'activation des caspases est impliquée dans le processus de maturation

érythroïde et pourrait jouer un rôle important dans ce phénomène. Une première étude a montré que les caspase-1, -2, -3, -5, -6, -7, -8, et -9 sont exprimées dans les cellules érythroïdes [10]. Les taux de procaspase-2, -3 et -8 sont nettement plus élevés dans les érythroblastes immatures que dans les érythroblastes matures (Gregoli *et al.*, 1999). Récemment, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle les caspases pourraient être activées au cours de l'érythropoïèse normale et expliquer les changements morphologiques observés au cours de la maturation terminale. Nous avons pu mettre en évidence que la caspase-3 est activée de façon transitoire au moment où les changements morphologiques des érythroblastes apparaissent (Zermati *et al.*, 2001). Cette activation se fait par la voie mitochondriale avec dépolarisation de sa membrane et activation de la caspase-9 (Zermati *et al.*, 2001). Nous avons également montré que l'activation de la caspase-3 est associée à l'activation de la caspase-6 et au clivage de la Lamine B, qui pourrait être responsable de la condensation nucléaire comme cela a été décrit au

cours de l'apoptose. De plus la protéine Acinus, responsable de la condensation de la chromatine mais pas de sa dégradation, est activée par clivage par la caspase-3 au cours de la différenciation érythroblastique. À l'inverse, bien que les caspases effectrices soient activées, les cellules n'entrent pas en apoptose puisqu'elles n'expriment pas de phosphatidyl sérine à leur membrane, et ICAD l'inhibiteur de CAD, nucléase responsable du clivage du DNA, n'est pas clivée, et GATA-1 n'est pas dégradée (Fig. 5) (Zermati *et al.*, 2001). L'addition d'un inhibiteur des caspases comme le z-VAD à la culture érythroïde juste avant la phase d'activation des caspases entraîne un blocage de la différenciation érythroïde au stade basophile (Zermati *et al.*, 2001). Cette observation a été récemment confirmée et approfondie par la démonstration du rôle essentiel de la caspase-3 dans la différenciation érythroïde à l'aide d'une stratégie d'inhibition spécifique de cette protéase par ARN interférence (siRNA) (Carlile *et al.*, 2004). Ces données ont aussi été confirmées dans les érythroblastes murins (Kolbus *et al.*, 2002). Dans ce modèle, il a été montré que l'hyper-

expression de Raf-1, qui prévient l'activation des caspases, empêche la maturation érythroïde en inhibant la différenciation induite par les caspases. Un phénomène opposé est observé chez les souris *Raf1^{-/-}* (Kolbus *et al.*, 2002). En plus des caspases, une étude récente suggère un rôle possible de p53 pendant les dernières étapes de la différenciation érythroblastique. Une expression importante de p53 est observée dans les érythroblastes acidophiles : cette activation de p53 pourrait être liée à la dégradation nucléaire qui a lieu dans ces cellules, sans l'exécution complète du processus apoptotique (Peller *et al.*, 2003).

Ainsi, le destin (apoptose versus différenciation) des précurseurs érythroïdes se décide en aval de l'activation de la caspase-3. Le passage apoptose versus différenciation serait donc déterminé par les cibles clivées par les caspases. Dans ce modèle de différenciation induite par les caspases, il reste à comprendre par quels mécanismes les cibles sont protégées du clivage puisque la protéine GATA-1 colocalise avec la caspase-3 activée dans le noyau.

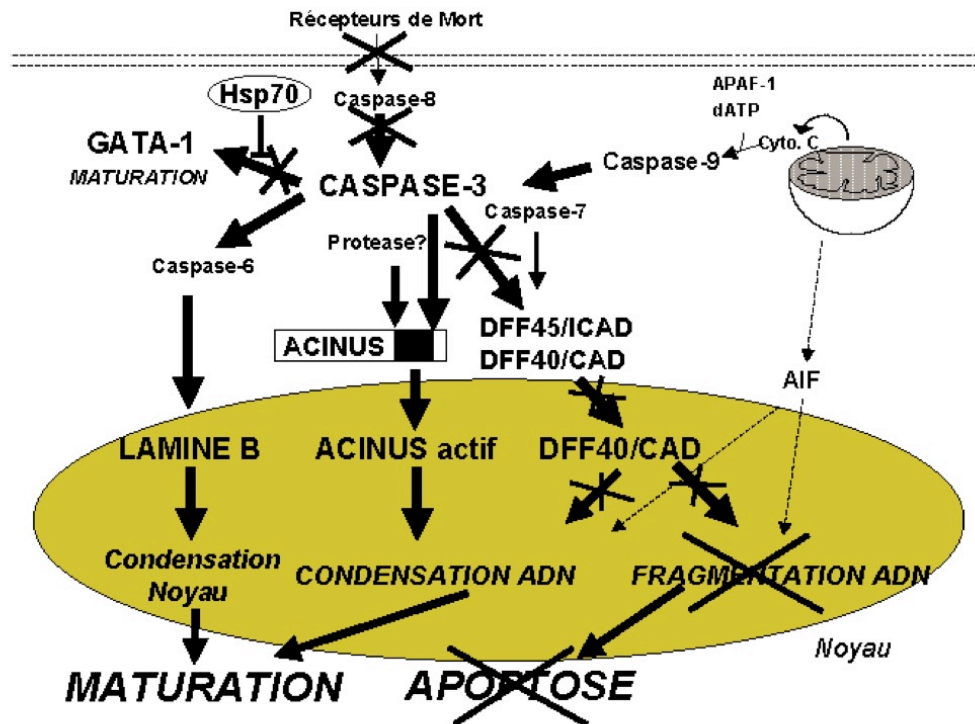


FIG. 5. – Rôle des caspases dans la maturation des érythroblastes. L'absence de clivage d'ICAD et de GATA-1 détermine le devenir de l'érythroblaste entre maturation et apoptose.

RÔLE DES CASPASES DANS LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES HEMATOPOÏÉTIQUES EN DEHORS DE L'ÉRYTHROPOÏÈSE ET DANS L'ACTIVATION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE

Le rôle des caspases dans la différenciation érythroblastique n'est pas limité à ce modèle et a été retrouvé dans d'autres processus de différenciation hématopoïétique et de régulation du système immunitaire.

Rôle des caspases dans le système immunitaire

La caspase-1 a été initialement identifiée comme la protéase responsable de la maturation d'une cytokine multifonctionnelle, l'Interleukine 1 β (IL-1 β) (Cerretti *et al.*, 1992). Il a ensuite été démontré qu'elle était également impliquée dans la maturation de l'IL-18 (Ghayur *et al.*, 1997). La caspase-3 interviendrait dans le processus de maturation de l'IL-16 des cellules T (Wu *et al.*, 1999). Les caspases sont impliquées dans l'activation lymphocytaire T et dans différentes voies de différenciation. L'activation de la caspase-3, sans apoptose, a été rapportée pour la première fois dans des lymphocytes T stimulés par la phytohématoglutinine (PHA) pendant les premières étapes de la prolifération lymphocytaire T (Miossec *et al.*, 1997). Ces résultats ont ensuite été confirmés et la participation de protéases de la famille de la caspase-3 a été mise en évidence dans l'activation lymphocytaire T après stimulation par des mitogènes et l'IL-2. Les mécanismes moléculaires d'activation des caspases dans ces systèmes restent à déterminer.

Rôle des caspases dans la différenciation des monocytes en macrophages

Une activation de la caspase-3 et de la caspase-9 est observée au cours de la différenciation des monocytes du sang circulant en macrophages en réponse au "macrophage colony-stimulating factor" (M-CSF), en l'absence d'apoptose. Cette activation des caspases n'est pas observée lors de la différenciation des monocytes en cellules dendritiques induite par l'IL-4 et le "granulocyte-macrophage colony-stimulating factor" (GM-CSF) (Sordet *et al.*, 2002). Lors de la différenciation macrophagique comme au cours de l'érythropoïèse (Zermati *et al.*, 2001), l'activation des caspases-3 et -9 est induite par la voie mitochondriale avec libération de cytochrome c mitochondrial et protéolyse d'Acinus alors qu'il semble que certains substrats tels que PARP soient protégés de l'activation des caspases (Sordet *et al.*, 2002). Cette différenciation est inhibée par un inhibiteur des caspases et par l'hyperexpression de Bcl2 (Sordet *et al.*, 2002). Les cibles et les mécanismes d'action des caspases dans ce processus restent à être élucidés.

Rôle des caspases dans la différenciation mégacaryocytaire

L'activation des caspases est également nécessaire à la différenciation mégacaryocytaire. Comme au cours de

l'érythropoïèse, les caspases jouent des rôles contrastés au cours de la mégacaryopoïèse. L'activation des caspases induite par Fas inhibe la mégacaryopoïèse. L'anticorps agoniste anti-CD95 induit un arrêt de différenciation des mégacaryocytes par activation des caspases (De Maria *et al.*, 1999). Un blocage de la différenciation est associé à la protéolyse de GATA-1 et de NF-E2 (De Maria *et al.*, 1999), deux facteurs de transcription essentiels pour la différenciation mégacaryocytaire terminale (Shivdasani *et al.*, 1995). Bien que la contribution du clivage des facteurs de transcription induit par la stimulation de CD95 dans l'arrêt de la mégacaryopoïèse reste à élucider, la déplétion de GATA-1 semble jouer un rôle majeur dans ce processus. Sur le plan phénotypique, les mégacaryocytes déficients en GATA-1 comme dans les cellules stimulées par l'anti-CD95 n'ont pas d'endomitose et leur prolifération est diminuée (De Maria *et al.*, 1999; Vyas *et al.*, 1999). Ainsi le clivage des facteurs de transcription semble un mécanisme responsable d'une régulation négative de la mégacaryopoïèse. Il a été mis initialement en évidence que, chez les souris surexprimant Bcl2 (Ogilvy *et al.*, 1999), ainsi que chez les souris invalidées pour le gène proapoptotique Bim (Bouillet *et al.*, 1999), le nombre de thrombocytes circulants est réduit de moitié alors que le nombre des mégacaryocytes médullaires reste inchangé. L'inhibition de la thrombocytogenèse par l'hyperexpression de Bcl2 semble indiquer que la voie intrinsèque de l'activation des caspases est impliquée dans le processus de libération des thrombocytes par les mégacaryocytes (Ogilvy *et al.*, 1999). De même, l'hyperexpression du gène antiapoptotique Bcl-x_L chez des souris transgéniques montre des anomalies de la fragmentation thrombocytaire (Kaluzhny *et al.*, 2002). Il a ensuite été rapporté que, comme dans l'érythropoïèse, l'activation des caspases était impliquée dans la mégacaryocytopoïèse humaine (De Botton *et al.*, 2002). Tout d'abord, chez l'Homme comme chez les modèles murins, la surexpression de Bcl2 ainsi que l'inhibition des caspases bloquent la formation des prothrombocytes (De Botton *et al.*, 2002). Puis il a été mis en évidence que l'activation des caspases a lieu à deux étapes de la maturation mégacaryocytaire : une première étape d'activation de la voie intrinsèque, avec la libération de cytochrome c et l'activation cytoplasmique de la caspase-9 et de la caspase-3, qui a lieu avant la phase de formation des prothrombocytes et est limitée à certains compartiments cellulaires seulement. Une seconde étape d'activation diffuse des caspases a lieu à la fin du processus de maturation après la libération des thrombocytes (De Botton *et al.*, 2002). La première phase d'activation des caspases ne s'accompagne pas de la mort de la cellule, alors que la seconde vague d'activation est associée à l'apoptose du mégacaryocyte (De Botton *et al.*, 2002). Le mécanisme de formation des prothrombocytes pourraient mimer les « blebbings » observés lors de l'apoptose (Mills *et al.*, 1999). Cependant ceux-ci restent localisés à des sous-compartiments cellulaires où se produit la formation des thrombocytes. La formation des prothrombocytes est associée à des changements majeurs du cytosquelette, incluant le clivage de la gelsoline,

l'activation des microtubules (Radley & Scurfield, 1980; Cramer *et al.*, 1997; Lecine *et al.*, 2000; Tablin *et al.*, 1990), la polymérisation de l'actine et la phosphorylation de la myosine (Italiano *et al.*, 1999; Rojnuckarin & Kauschansky, 2001; Kelley *et al.*, 2000; Kunishima *et al.*, 2001). Plusieurs molécules du cytosquelette ou régulatrices de l'actine, comme la gelsoline, régulateur de la famille des Rho guanosine triphosphatases (GTPases), ou leurs effecteurs ont été décrits comme des substrats des caspases responsables lors de l'apoptose de la formation des blebbings membranaires par inhibition de la myosine phosphatase (Kimura *et al.*, 1996; Sebbagh *et al.*, 2001, Coleman *et al.*, 2001). Au cours de ces phénomènes, les facteurs de transcription GATA-1 et NF-E2 ne sont pas clivés. Contrairement à l'érythropoïèse où les caspases colocalisent avec GATA-1, cette absence de clivage pourrait être liée à une localisation différentielle des caspases au cours de la différenciation et de l'apoptose.

MISE EN ÉVIDENCE DE L'IMPLICATION DES CASPASES DANS LES PROCESSUS DE DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE EN DEHORS DE L'HEMATOPOÏÈSE

Les premières preuves d'un rôle des caspases au cours de la différenciation cellulaire proviennent des études sur les cellules du cristallin (Ishizaki *et al.*, 1998; Wride *et al.*, 1999) et les kératinocytes (Weil *et al.*, 1999). Chez les rongeurs, lorsque les cellules épithéliales du cristallin acquièrent leurs caractéristiques de différenciation terminale, un membre de la sous-famille caspase-3 est activé et est impliqué dans les modifications cytologiques morphologiques qui permettent la formation des fibres du cristallin (Ishizaki *et al.*, 1998). L'inhibition des caspases bloque l'énucélation des cellules du cristallin qui a lieu lors de la phase terminale de maturation des cellules (Ishizaki *et al.*, 1998). Ce processus est sous la dépendance du "Fibroblast Growth Factor" (FGF) nécessaire à la différenciation et à la protection de l'apoptose (Ishizaki *et al.*, 1998). Il a également été montré que les caspases sont activées par la voie mitochondriale lors de la différenciation des kératinocytes (Weil *et al.*, 1999) et que cette activation est nécessaire pour l'expulsion du noyau qui a lieu lors de la phase terminale de maturation. Récemment il a été mis en évidence que la caspase-14 est activée pendant la différenciation des kératinocytes (Chien *et al.*, 2002).

L'activation des caspases est impliquée dans les modifications morphologiques terminales de la spermatogénèse chez la *Drosophila* (Arama *et al.*, 2003). A noter que, chez cet insecte, les caspases sont activées uniquement dans le cytoplasme car une activation nucléaire entraîne une hypercondensation nucléaire et une stérilité (Arama *et al.*, 2003). Les caspases nucléaires sont inhibées par une protéine de la famille des IAP (Arama *et al.*, 2003). Ainsi, chez ce modèle, la régulation de l'activité des caspases serait sous la dépendance de la localisation nucléaire et/ou cytoplasmique des IAP.

De même, les modifications cellulaires observées lors de la différenciation des cellules du muscle strié ont des points communs avec les modifications morphologiques décrites lors de l'apoptose (Fernando *et al.*, 2002). Par exemple la réorganisation de l'actine est observée lors des deux phénomènes. La kinase de la chaîne légère de la myosine est une protéine du muscle contractile qui est nécessaire aux blebbings membranaires des cellules apoptotiques. Au cours de la différenciation du muscle strié, la caspase-3 est impliquée dans la myogénèse chez la Souris. La caspase-3 active une kinase (MST1) qui est impliquée dans la myogénèse qui aurait comme substrats des membres de la voie p38 MAPK (Fernando *et al.*, 2002). Ces kinases induisent la myogénèse en phosphorylant et en augmentant l'activité de facteur de transcription du muscle squelettique (Fernando *et al.*, 2002). La phase de fusion des myoblastes de rat est sous la dépendance de la diminution de l'expression de la calpastatine. La caspase-1 est indispensable à ce processus, car elle clive la calpastatine (Barnoy & Kosower, 2003). A noter que la protéine anti-apoptotique Bcl2 est exprimée dans les premières étapes de prolifération de la myogénèse, mais ne l'est plus lors de la phase de différenciation des myoblastes (Huppertz *et al.*, 2001; Dominov *et al.*, 1998). Le facteur de transcription FKHR qui induit habituellement l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose est nécessaire pour la fusion des myoblastes de souris (Bois & Grosfeld, 2003).

Au cours du processus de transformation oncogénique, un arrêt d'activation « physiologique » des caspases pourrait contribuer au blocage de la différenciation. Ainsi l'étude de la différenciation des cellules de carcinome du côlon HT29 par du butyrate met en évidence d'une part que la caspase-3 et la caspase-9 sont activées et d'autre part que cette différenciation est inhibée par l'hyper-expression de Bcl-x_L (Cai *et al.*, 2004).

MÉCANISMES DE RÉSISTANCE DES CELLULES EN COURS DE DIFFÉRENCIATION À L'APOPTOSE LORS DE LA PHASE D'ACTIVATION DES CASPASES

Dans les modèles présentés ci-dessus, où les caspases jouent un rôle dans la différenciation, se pose le problème des mécanismes responsables de l'absence d'apoptose alors que les caspases sont activées. Comme nous l'avons vu, plusieurs hypothèses peuvent être émises. Le taux d'activation des caspases pourrait être différent au cours de l'apoptose et de la différenciation, et certains substrats pourraient avoir une plus forte affinité (clivage au cours de la différenciation) que d'autres (clivage au cours de l'apoptose). Cette hypothèse semble peu probable puisque, dans la plupart des modèles, les taux d'activation des caspases ne semblent pas significativement différents entre différenciation et apoptose. Par exemple, le taux d'activation des caspases retrouvé dans les lymphocytes T proliférants ou en voie d'activation, est très nettement supérieur à celui trouvé dans des cel-

lules tumorales en apoptose, suggérant l'existence d'un mécanisme antiapoptotique fort en aval de l'activation de la caspase-3 qui inhiberait une mort inappropriée et prématurée de ces cellules (Wilhelm *et al.*, 1998).

Au cours de la différenciation érythroïde terminale humaine, la caspase-3 activée colocalise avec GATA-1 dans le noyau de cellules érythroïdes, au cours de la différenciation comme lors de l'apoptose par privation en EPO (Ribeil *et al.*, 2004). Bcl-x_L est la principale protéine anti-apoptotique connue jusqu'ici pour son implication dans l'érythropoïèse, en amont de la cascade d'activation des caspases, où elle inhibe l'ouverture des pores mitochondriaux et ainsi la libération de molécules pro-apoptotiques (cytochrome c, Smac/DIABLO) de la mitochondrie vers le cytosol. Ainsi, l'expression de Bcl-x_L, dont le rôle se situe en amont de l'activation des caspases, ne peut pas expliquer la différence de protection spécifique de certains substrats des caspases entre les érythroblastes cultivés en présence d'EPO et ceux dont l'apoptose est induite par privation en EPO.

Dans certains modèles comme celui des mégacaryocytes, l'activation des caspases pourrait se situer dans différents compartiments subcellulaires et expliquer les différences entre apoptose et différenciation. Les mécanismes qui sous-tendent ces différences de localisation ne sont actuellement pas connus. Dans d'autres modèles, des inhibiteurs des caspases comme les IAP pourraient

se localiser dans différents compartiments pour bloquer de façon élective l'activation des caspases et protéger certaines cibles, par exemple comme dans le modèle de la spermatogenèse de la Drosophile (Arama *et al.*, 2003).

Une autre hypothèse suggère que des molécules anti-apoptotiques pourraient, en fonction de leur localisation cellulaire, agir sur la cible pour empêcher son clivage par les caspases. Ce modèle pourrait s'appliquer à l'érythropoïèse par l'intervention des protéines de choc thermique (heat shock proteins, Hsp).

Les Hsps, définies à l'origine pour leur rôle cytoprotecteur contre le choc thermique, constituent une classe de protéines très conservées dans l'évolution. Parmi les heat shock protéins, la famille Hsp70 est constituée de plusieurs membres dont la protéine Hsp70 inducible par le stress. Dans les conditions normales, les Hsp70 sont des molécules chaperonnes ATP-dépendantes impliquées dans la conformation des polypeptides nouvellement synthétisés, l'assemblage des complexes multi-protéiques et le transport protéique transmembranaire (Shi & Thomas, 1998). L'expression d'Hsp70 inducible a été observée au cours de stress, en réponse à des stimuli apoptotiques par activation de protéines kinases activées par le stress, la génération de radicaux libres, la modification du potentiel transmembranaire mitochondrial, la libération de cytochrome c de la mitochondrie et l'activation de caspases de type caspase-3 (Jaattela *et al.*, 1998). La

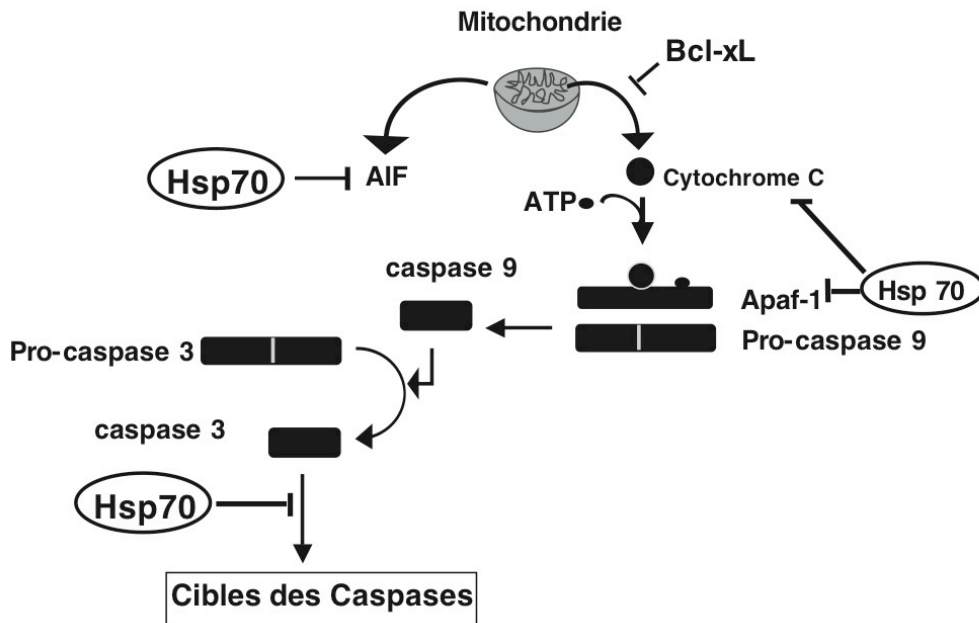


FIG. 6. – Rôle anti-apoptotique d'Hsp70.

synthèse de la protéine Hsp70 inductible augmente la capacité des cellules stressées à faire face à une concentration accrue de protéines non repliées ou dénaturées (Nollen *et al.*, 1999). L'expression d'Hsp70 inductible est augmentée dans les cellules cancéreuses de souris (Jaattela, 1995) et peut inhiber l'apoptose, augmentant ainsi le temps de survie de cellules exposées à différents stimuli létaux (Jaattela *et al.*, 1992; Mosser *et al.*, 1997). En effet, la surexpression d'Hsp70 inductible réduit ou bloque l'activation des caspases et supprime les altérations mitochondriales et les fragmentations nucléaires (Buzzard *et al.*, 1998). Hsp70 protège les cellules de l'apoptose en agissant à la fois en amont et en aval de l'activation de la cascade des caspases. Hsp70 inhibe en effet l'apoptose en aval de la mitochondrie et en amont de l'activation de la caspase-3 en s'associant aux protéines apoptotiques incluant le cytochrome c (Li *et al.*, 2000) et Apaf-1, ce qui prévient le recrutement de la pro-caspase-9 et la formation de l'apoptosome (Fig. 6). Par ailleurs, Hsp70 inhibe également l'apoptose, en amont de l'activation de la caspase-3, en s'associant à AIF (Apoptosis Inducing Factor) (Kroemer, 2001) (Fig. 6). Dans des expériences de surexpression d'Hsp70 dans la lignée ME-180 de carcinome cervical humain, l'action anti-apoptotique d'Hsp70 contre l'effet de la staurosporine peut aussi s'exercer en aval de l'activation des caspases en bloquant la fragmentation de l'ADN (Jaattela *et al.*, 1998) (Fig. 6). En effet, ces cellules sont capables de reprendre une croissance normale malgré la libération de cytochrome c et le clivage de substrats des caspases comme PARP, PKC delta et cPLA₂ (Jaattela *et al.*, 1998). Ces résultats indiquent que, dans certaines conditions, le point de non-retour dans la voie de l'apoptose se situe en aval de l'activation des caspases. Dans ce modèle, comme dans les érythroblastes en cours de maturation, la caspase-3 est activée alors que l'apoptose est inhibée. Nous avons émis l'hypothèse que la protéine Hsp70 pourrait agir en aval de la caspase-3 pour protéger les érythroblastes de l'apoptose lors de la différenciation érythroïde terminale pendant la phase d'activation des caspases. Nos résultats préliminaires suggèrent qu'au cours de la différenciation érythroblastique, GATA-1 serait ainsi protégé par Hsp70 du clivage par les caspases (Ribeil *et al.*, 2004). Nous avons mis en évidence qu'Hsp70 inductible est une protéine qui, au cours de la différenciation érythroïde terminale, par son interaction avec une de ses cibles joue un nouveau rôle antiapoptotique majeur en empêchant le clivage de GATA-1 par la caspase-3 (Fig. 5). La protéine Hsp70 est localisée dans le cytoplasme et le noyau où elle colocalise avec GATA-1 au cours de la différenciation érythroblastique. Au cours de l'apoptose induite par la privation en EPO, Hsp70 serait délocalisée du noyau vers le cytoplasme permettant ainsi le clivage de GATA-1 par la caspase-3 activée. Nous proposons donc un modèle dans lequel l'EPO détermine le destin des érythroblastes (apoptose versus différenciation) en aval de la caspase-3, en régulant la localisation d'Hsp70 (cytoplasmique versus nucléaire et cytoplasmique).

CONCLUSION

Dans cette revue, nous avons discuté le rôle des caspases dans les processus de différenciation cellulaire lors de l'hématopoïèse, en particulier à travers l'exemple de l'érythropoïèse, et dans d'autres types cellulaires en dehors de l'hématopoïèse. Ces modèles suggèrent que les caspases, des enzymes responsables de l'apoptose, sont également indispensables à de nombreux processus de différenciation. Ainsi comme souligné depuis de nombreuses années, différenciation et apoptose sont des processus proches. Le clivage de certaines cibles, et pas d'autres, par les caspases pourrait déterminer le choix du destin cellulaire entre apoptose et différenciation. Cette proximité est sans doute importante pour permettre à l'organisme de s'adapter à certaines conditions pathologiques. Par exemple au cours de l'érythropoïèse, les tissus doivent être oxygénés en permanence, mais le nombre de globules rouges ne doit pas être trop important; un certain niveau d'apoptose des érythroblastes peut rapidement faire place à la différenciation et la production de globules rouges pour répondre au stress hypoxique. Ces mécanismes de régulation fine pourraient être perturbés dans de nombreux tissus et dans de nombreuses circonstances pathologiques et pourraient ouvrir une nouvelle voie dans la compréhension de la physiopathologie de certaines proliférations tumorales et/ou de certaines pathologies dégénératives. D'un point de vue finaliste le fait que des enzymes responsables de la mort cellulaire soient impliquées dans la différenciation pourrait obéir à une certaine logique. Les erreurs dans la différenciation pourraient conduire à la mort cellulaire évitant ainsi la transmission de ces erreurs qui seraient nuisibles à l'espèce. A quoi bon d'ailleurs le blocage des caspases pour empêcher la mort de l'organisme, ce qui ne lui permettrait pas de survivre, ce blocage empêchant également sa différenciation. Cette proximité entre mort et différenciation permet la mort de l'organisme une fois qu'il s'est différencié et favorise ainsi l'évolution et la diversité de l'espèce.

BIBLIOGRAPHIE

- Arama E., Agapite J. & Steller H., Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Dev. Cell.*, 2003, 4, 687-697.
- Barnoy S. & Kosower N. S., Caspase-1-induced calpastatin degradation in myoblast differentiation and fusion: cross-talk between the caspase and calpain systems. *FEBS Lett.* 2003, 546, 213-217.
- Bois P. R. & Grosveld G. C., FKHR (FOXO1a) is required for myotube fusion of primary mouse myoblasts. *Embo J.* 2003, 22, 1147-1157.
- Bouillet P., Metcalf D., Huang D. C., Tarlinton D. M., Kay T. W., Kontgen F., *et al.*, Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science*, 1999, 286, 1735-1738.
- Brahimi-Horn C., Mazure N. & Pouyssegur J., Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple post-translational modifications. *Cell. Signal.*, 2005, 17, 1-9.

- Buzzard K. A., Giaccia A. J., Killender M. & Anderson R. L., Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 17147-17153.
- Cai J., Chen Y., Murphy T. J., Jones D. P. & Sartorelli A. C., Role of caspase activation in butyrate-induced terminal differentiation of HT29 colon carcinoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2004, 424, 119-127.
- Cantor A. B. & Orkin S. H., Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene*, 2002, 21, 3368-3376.
- Carlisle G. W., Smith D. H. & Wiedmann M., Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood*, 2004, 103, 4310-4316.
- Cerretti D. P., Kozlosky C. J., Mosley B., Nelson N., Van Ness K., Greenstreet T. A. *et al.*, Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*, 1992, 256, 97-100.
- Chien A. J., Presland R. B. & Kuechle M. K., Processing of native caspase-14 occurs at an atypical cleavage site in normal epidermal differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, 296, 911-917.
- Coleman M. L., Sahai E. A., Yeo M., Bosch M., Dewar A. & Olson M. F., Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.*, 2001, 3, 339-345.
- Cramer E. M., Norol F., Guichard J., Breton-Gorius J., Vainchenker W., Masse J. M. *et al.*, Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand. *Blood*, 1997, 89, 2336-2346.
- De Botton S., Sabri S., Daugas E., Zermati Y., Guidotti J. E., Hermine O. *et al.*, Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood*, 2002, 100, 1310-1317.
- De Maria R., Testa U., Luchetti L., Zeuner A., Stassi G., Pelosi E. *et al.*, Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood*, 1999, 93, 796-803.
- De Maria R., Zeuner A., Eramo A., Domenichelli C., Bonci D., Grignani F. *et al.*, Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*, 1999, 401, 489-493.
- Dominov J. A., Dunn J. J. & Miller J. B., Bcl-2 expression identifies an early stage of myogenesis and promotes clonal expansion of muscle cells. *J. Cell Biol.*, 1998, 142, 537-544.
- Fernando P., Kelly J. F., Balazsi K., Slack R. S. & Megoney L. A., Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 11025-11030.
- Ghayur T., Banerjee S., Hugunin M., Butler D., Herzog L., Carter A. *et al.*, Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature*, 1997, 386, 619-623.
- Gregoli P. A. & Bondurant M. C., Function of caspases in regulating apoptosis caused by erythropoietin deprivation in erythroid progenitors. *J. Cell. Physiol.*, 1999, 178, 133-143.
- Gregory C. J. & Eaves A. C., Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood*, 1978, 51, 527-537.
- Huppertz B., Tews D. S. & Kaufmann P., Apoptosis and syncytial fusion in human placental trophoblast and skeletal muscle. *Int. Rev. Cytol.*, 2001, 205, 215-253.
- Ishizaki Y., Jacobson M. D. & Raff M. C., A role for caspases in lens fiber differentiation. *J. Cell Biol.*, 1998, 140, 153-158.
- Italiano J. E. Jr., 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.*, 1999, 147, 1299-1312.
- Jaattela M., Wissing D., Bauer P. A. & Li G. C., Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *Embo J.*, 1992, 11, 3507-3512.
- Jaattela M., Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *Int. J. Cancer*, 1995, 60, 689-693.
- Jaattela M., Wissing D., Kokholm K., Kallunki T. & Egeblad M., Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *Embo J.*, 1998, 17, 6124-6134.
- Kaluzhny Y., Yu G., Sun S., Toselli P. A., Nieswandt B., Jackson C. W. *et al.*, BclxL overexpression in megakaryocytes leads to impaired platelet fragmentation. *Blood*, 2002, 100, 1670-1678.
- Kelley M. J., Jawien W., Ortel T. L. & Korczak J. F., Mutation of MYH9, encoding non-muscle myosin heavy chain A, in May-Hegglin anomaly. *Nat. Genet.* 2000, 26, 106-108.
- Kimura K., Ito M., Amano M., Chihara K., Fukata Y., Nakafuku M. *et al.*, Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, 1996, 273, 245-248.
- Kolbus A., Pilat S., Husak Z., Deiner E. M., Stengl G., Beug H. *et al.*, Raf-1 antagonizes erythroid differentiation by restraining caspase activation. *J. Exp. Med.*, 2002, 196, 1347-1353.
- Koury M. J. & Bondurant M. C., Control of red cell production: the roles of programmed cell death (apoptosis) and erythropoietin. *Transfusion*, 1990, 30, 673-674.
- Koury M. J., Sawyer S. T. & Brandt S. J., New insights into erythropoiesis. *Curr. Opin. Hematol.*, 2002, 9, 93-100.
- Kroemer G., Dallaporta B. & Resche-Rigon M., The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.*, 1998, 60, 619-642.
- Kroemer G., Heat shock protein 70 neutralizes apoptosis-inducing factor. *ScientificWorld Journal*, 2001, 1, 590-592.
- Kunishima S., Kojima T., Matsushita T., Tanaka T., Tsurusawa M., Furukawa Y. *et al.*, Mutations in the NMMHC-A gene cause autosomal dominant macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions (May-Hegglin anomaly/Sebastian syndrome). *Blood*, 2001, 97, 1147-1149.
- Lecine P., Italiano J. E. Jr., Kim S. W., Villeval J. L. & Shivdasani R. A., Hematopoietic-specific beta 1 tubulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2. *Blood*, 2000, 96, 1366-1373.
- Li C. Y., Lee J. S., Ko Y. G., Kim J. I. & Seo J. S., Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 25665-25671.
- Mills J. C., Stone N. L. & Pittman R. N., Extranuclear apoptosis. The role of the cytoplasm in the execution phase. *J. Cell Biol.*, 1999, 146, 703-708.
- Miossec C., Dutilleul V., Fassy F. & Diu-Hercend A., Evidence for CPP32 activation in the absence of apoptosis during T lymphocyte stimulation. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 13459-13462.
- Mosser D. D., Caron A. W., Bourget L., Denis-Larose C. & Massie B., Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, 1997, 17, 5317-5327.
- Nollen E. A., Brunsting J. F., Roelofs H., Weber L. A. & Kampinga H. H., *In vivo* chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol. Cell Biol.*, 1999, 19, 2069-2079.
- Ogilvy S., Metcalf D., Print C. G., Bath M. L., Harris A. W. & Adams J. M., Constitutive Bcl-2 expression throughout the hematopoietic compartment affects multiple lineages and enhances progenitor cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 14943-14948.
- Peller S., Frenkel J., Lapidot T., Kahn J., Rahimi-Levene N., Yona R. *et al.*, The onset of p53-dependent apoptosis plays a role in terminal differentiation of human normoblasts. *Oncogene*, 2003, 22, 4648-4655.
- Radley J. M. & Scurfield G., The mechanism of platelet release. *Blood*, 1980, 56, 996-999.
- Ribeil J. A., Zermati Y., Kersual J., Dussiot M., Audat F., Pouzet C., Valensi F., Varet B., Solary E., Garrido C. & Hermine O., Hsp70 is a new major regulator of erythropoiesis

- by preventing caspase-3 mediated cleavage of GATA-1. *American Society of Hematology*, 2004 Dec. 4-7 San Diego, *Blood* 2004, 104, 168.
- Rojnuckarin P. & Kaushansky K., Actin reorganization and proplatelet formation in murine megakaryocytes: the role of protein kinase calpha. *Blood*, 2001, 97, 154-161.
- Sebbagh M., Renvoize C., Hamelin J., Riche N., Bertoglio J. & Breard J., Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat. Cell. Biol.*, 2001, 3, 346-352.
- Shi Y. & Thomas J. O., The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol. Cell. Biol.*, 1992, 12, 2186-2192.
- Shivdasani R. A., Rosenblatt M. F., Zucker-Franklin D., Jackson C. W., Hunt P., Saris C. J. *et al.*, Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell*, 1995, 81, 695-704.
- Sordet O., Rebe C., Plenchette S., Zermati Y., Hermine O., Vainchenker W. *et al.*, Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood*, 2002, 100, 4446-4453.
- Tablin F., Castro M. & Leven R. M., Blood platelet formation *in vitro*. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *J. Cell. Sci.*, 1990, 97, 59-70.
- Vyas P., Ault K., Jackson C. W., Orkin S. H. & Shivdasani R. A., Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood*, 1999, 93, 2867-2875.
- Weil M., Raff M. C. & Braga V. M., Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr. Biol.*, 1999, 9, 361-364.
- Wilhelm S., Wagner H. & Hacker G., Activation of caspase-3-like enzymes in non-apoptotic T cells. *Eur. J. Immunol.* 1998, 28, 891-900.
- Wride M. A., Parker E. & Sanders E. J., Members of the bcl-2 and caspase families regulate nuclear degeneration during chick lens fibre differentiation. *Dev. Biol.*, 1999, 213, 142-156.
- Wu D. M., Zhang Y., Parada N. A., Kornfeld H., Nicoll J., Center D. M. *et al.*, Processing and release of IL-16 from CD4⁺ but not CD8⁺ T cells is activation dependent. *J. Immunol.*, 1999, 162, 1287-1293.
- Zermati Y., Garrido C., Amsellem S., Fishelson S., Bouscary D., Valensi F. *et al.*, Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J. Exp. Med.*, 2001, 193, 247-254.

Annexe 2

Human erythroleukemia: is the two-hit model of mouse leukemogenesis valid in human disease?

Leukemia (2007) 21, 2212–2214; doi:10.1038/sj.leu.2404779; published online 31 May 2007

Human erythroleukemia (HEL) is a rare heterogeneous entity representing 3–4% of acute myeloid leukemia (AML).¹ According to the World Health Organization (WHO), HEL is classified into three subgroups: (1) leukemia with multi-lineage dysplasia; (2) therapy-related AML and myelodysplastic syndromes and (3) acute erythroid leukemia subdivided in erythroleukemia (erythroid/myeloid) and pure erythroid leukemia. HEL affects preponderant males, and the age distribution of the disease appears to be bimodal, with a smaller peak below 20 years and a more definitive and broader peak in the seventh decade of life.² The oncogenesis of erythroleukemia in humans is not well known and may differ in the different subgroups. In animal models, erythroleukemia was recently proposed to evolve a multistep oncogenic process.³ In transgenic mice, Spi-1/PU.1 hyperexpression induces the emergence of erythropoietin (Epo)-

dependent proerythroblasts. This early blockage in erythroblast differentiation leads to anemia that can be treated by transfusion. However, in particular circumstances, growth-factor-independent malignant cells emerge leading to an acute leukemic phase. This oncogenic event is associated with the gain-of-function mutations in the *Kit* gene, conferring a constitutive receptor kinase activity and cell proliferation related to Erk1/2 and PI3K/Akt pathways activation. Nevertheless, this two-hit model of leukemogenesis has not been yet described in human erythroleukemia. We studied here the case of a 60-year-old male fulfilling the WHO classification criteria for erythroid leukemia (erythroblasts immunophenotyped as CD36⁺, GPA⁺, c-Kit⁺, GP41⁻) with multiple karyotype abnormalities. This patient showed a massive (over 60%) bone marrow proerythroblastic infiltration (Figure 1a). In order to study the response of HEL blasts to the major erythroid growth factor, patient bone marrow aspirates were cultured in the presence or absence of Epo. The addition of Epo in culture medium allowed a long-term survival of blast cells (Figure 1b). These data suggest that blasts

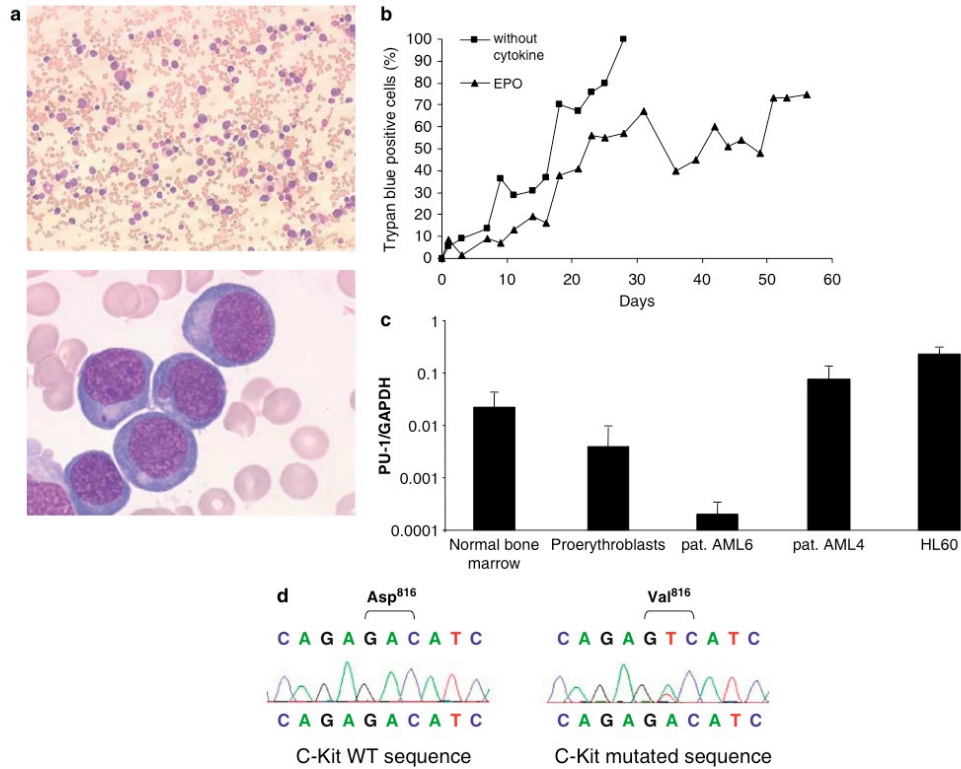


Figure 1 (a) Bone marrow aspirate smear containing undifferentiated cells having basophilic cytoplasm and round cell nucleus characteristic of proerythroblasts (May–Grunewald–Giemsa magnification $\times 400$ and $\times 1000$). (b) Cell proliferation curves of cultured proerythroblasts in the presence or absence of erythropoietin (2 U/ml). (c) Real-time quantitative reverse transcription-PCR analysis for PU.1 mRNA expression. Values obtained for normal bone marrow, cultured proerythroblasts, AML6 and AML4 patient blasts and HL60 cell line were graphed relative to GAPDH mRNA. Standard deviation of triplicates is represented. (d) Direct sequencing of *c-Kit* exon17: wt sequence found in the AML6 and D816V mutation found in a *c-Kit* mutated mastocytosis patient.

were Epo-sensitive, and therefore specific of erythroid lineage. We also investigated whether the multistage leukemogenesis recently described could be valid in this case of HEL. We sought for the possible hyper-expression of PU.1 in these cells. However, reverse transcription-PCR for PU.1 was negative for this patient (Figure 1c). These results suggest that in this case, high expression of *spi-1/PU.1* is not involved in the arrest of proerythroblast differentiation as in the mouse model. GATA-1 has been shown to play a critical role in terminal erythroid differentiation,⁴ and mutations in this gene have been linked to several human hematological disorders including X-linked dyserythropoietic anemia and thrombocytopenia, X-linked thrombocytopenia and beta-thalassemia, and Down's syndrome acute megakaryoblastic leukemia. However, sequencing of GATA-1 shows that this transcription factor was not mutated in this case of human erythroleukemia (not shown). In *Spi-1/PU.1* transgenic mouse, the second event (cell proliferating induction step) of leukemogenesis is the induction of constitutive activation of *c-Kit* due to mutations in codons 814 or 818. However, the most frequent activating mutations in human

neoplasia (codons 560 and 816) were not mutated in this leukemia (Figure 1d and not shown). Moreover, the complete sequence of the gene shows that *c-Kit* gene does not present any particular mutation of exon 8 as observed in some human neoplasia including AML and lymphoma (not shown). We also sequenced the Epo-R adaptor JAK2, since it was recently reported that JAK2 mutation (V617F) is present in most patients with polycythemia vera (PV), myelodysplasia (MSD) and essential thrombocytemia (ET) and some primary myelofibrosis.⁵ However, this JAK2 mutation was not present in this patient. Altogether, our data suggest that this particular case of human erythroleukemia does not follow the two-hit model of leukemogenesis observed in transgenic mice. In humans, the only two-hit model described so far is the core binding factor AML⁶ in which AML1/ETO or CBF/MYH11 translocation induces myeloid differentiation arrest, and *c-Kit*, Ras or FLT-3 mutations induce cell proliferation and inhibition of apoptosis. Therefore, further investigations in human erythroleukemia are needed to understand the leukemogenesis involved in this still incurable disease.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Fondation pour la Recherche Médicale (SC), INSERM (poste d'accueil, interne en biologie) (CC), the Association pour la Recherche contre le Cancer and Institut National du Cancer (INCA), Arreca, Canceropole Ile de France.

S Coulon¹, J Vandekerckhove¹, M Dussiot¹, C Callens¹,
F Suarez², J Kersual¹, V Asnañ³, Z Belaid¹, G Courtois¹,
S Giraudier⁴, P Dubreuil⁵, Y Lepelletier¹, IC Moura^{1,6} and
O Hermine^{1,2}

¹CNRS UMR 8147, Université Paris V, Hôpital Necker, Paris, France;

²Service d'hématologie, Hôpital Necker, Paris, France;

³Service d'hématologie biologique, Hôpital Necker, Paris, France;

⁴Service d'hématologie biologique, Hôpital Henri Mondor, Paris, France and

⁵Hématopoïèse moléculaire et fonctionnelle, U119 INSERM, Marseille, France

E-mail: hermine@necker.fr

⁶Current address: INSERM U699, Paris, France

References

- 1 Davey FR, Abraham Jr N, Brunetto VL, MacCallum JM, Nelson DA, Ball ED et al. Morphologic characteristics of erythroleukemia (acute myeloid leukemia; FAB-M6): a CALGB study. *Am J Hematol* 1995; 49: 29–38.
- 2 Kowal-Vern A, Mazzella FM, Cotelingam JD, Shrit MA, Rector JT, Schumacher HR. Diagnosis and characterization of acute erythroleukemia subsets by determining the percentages of myeloblasts and proerythroblasts in 69 cases. *Am J Hematol* 2000; 65: 5–13.
- 3 Kosmider O, Denis N, Lacout C, Vainchenker W, Dubreuil P, Moreau-Gachelin F. Kit-activating mutations cooperate with Spi-1/PU 1 overexpression to promote tumorigenic progression during erythroleukemia in mice. *Cancer Cell* 2005; 8: 467–478.
- 4 Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 1215–1227.
- 5 James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434: 1144–1148.
- 6 Boissel N, Leroy H, Brethon B, Philippe N, de Botton S, Auvrignon A et al. Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Leukemia* 2006; 20: 965–970.

NOUVELLE

Hsp70, l'ange gardien de GATA-1 lors de la différenciation des globules rouges

Julie Vandekerckhove, Jean-Antoine Ribeil, Yaël Zermati, Carmen Garrido, Geneviève Courtois, Eric Solary, Olivier Hermine

J. Vandekerckhove, J.A. Ribeil, G. Courtois O. Hermine : CNRS UMR 8147 et Département d'Hématologie, Faculté de Médecine et Université René Descartes Paris V, Hôpital Necker, 75743 Paris Cedex 15, France.
Y. Zermati : Département d'hématologie, Institut Cochin, Paris, France.
C. Garrido, E. Solary : Inserm, UMR 517, 21079 Dijon, France. hermine@necker.fr



>L'érythropoïèse est le processus permettant la production des globules rouges matures à partir de cellules souches hématopoïétiques, et il est finement régulé par l'effet combiné du microenvironnement médullaire –au sein de structures appelées îlots érythroblastiques– et par des facteurs de croissance. Ce programme de différenciation est en grande partie sous le contrôle du facteur de transcription GATA-1. Celui-ci active la transcription de gènes érythroïdes, comme ceux qui codent pour la glycophorine, les chaînes de l'hémoglobine et le récepteur de l'érythropoïétine (ÉpoR) ainsi que le gène de survie *BclX_L*.

Les progéniteurs érythroïdes les plus précoces appelés BFU-E (*burst forming unit-erythroid*), ainsi nommés parce que *in vitro* en milieu semi-solide, ces progéniteurs produisent des colonies éclatées en multiples agrégats), requièrent la présence de *stem cell factor* (SCF) et d'érythropoïétine (Épo) [1] ; ils donnent naissance aux progéniteurs CFU-E (*colony-forming unit-erythroid*) qui eux, sous le contrôle strict de l'Épo, vont se différencier en cellules morphologiquement identifiables de la lignée érythroblastique, les proérythroblastes. Ces proérythroblastes vont ensuite se différencier successivement en érythroblastes basophiles, polychromatophiles et acidophiles. L'énucléation de l'érythroblaste acidophile donne naissance aux réticulocytes qui mûrissent finalement en globules rouges (Figure 1). Le SCF et l'Épo sont les deux cytokines principales nécessaires à la production des globules rouges. La production d'Épo est régulée par l'oxygénation rénale, permet-

tant ainsi le contrôle de la production de globules rouges. La baisse du taux d'Épo va diminuer les signaux de prolifération et surtout induire l'apoptose des érythroblastes et ainsi diminuer la production des globules rouges. Par ailleurs il a été montré que les érythroblastes immatures expriment à leur surface le récepteur de mort Fas, alors que les plus matures expriment Fas-L [2]. Ainsi au sein de l'îlot érythroblastique, les érythroblastes les plus matures interagissent avec les plus immatures et induisent l'activation de Fas, ce qui a pour conséquence l'activation des caspases.

Implication de la caspase 3 dans l'apoptose des érythroblastes et le contrôle de l'érythropoïèse

L'apoptose des érythroblastes est dépendante des caspases, et, de ce fait, les caspases et en particulier la caspase-3, enzyme principale effectrice de l'apoptose,

jouent un rôle majeur dans la régulation de l'érythropoïèse. En effet, l'absence d'activation de la voie Jak2/STAT5 normalement induite par le récepteur de l'Épo conduit à une diminution de l'expression de *BclX_L*, diminution responsable de la dépolarisation de la mitochondrie et de l'activation de la caspase 9 au sein de l'apoptosome, qui elle-même va activer la caspase 3. Au cours de ce processus apoptotique, la caspase-3, en clivant GATA-1, entraîne une amplification de la diminution d'expression de *BclX_L* (en diminuant l'effet transactivateur de GATA-1 sur le gène codant *BclX_L*) et également un arrêt de maturation (en diminuant l'effet transactivateur de GATA-1 sur les gènes codant les gènes de la différenciation érythroïde). L'activation de Fas va induire l'activation de la caspase 8, qui elle va cliver la protéine bid en tbid, qui induit une dépolarisation de la mitochondrie. À ce niveau, l'Épo,

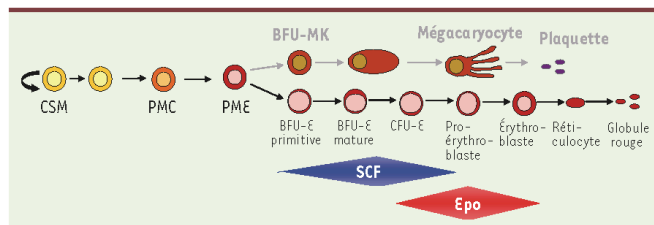


Figure 1. L'érythropoïèse est le processus permettant la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en globules rouges matures. La dépendance en érythropoïétine débute au stade BFU-E et s'arrête au stade proérythroblaste, le SCF débute son action en amont. L'expression des marqueurs de surface utilisés pour caractériser les différents précurseurs érythroïdes est indiquée. CSH : cellule souche hématopoïétique ; PMC : progéniteur myéloïde commun ; PME : progéniteur commun mégacaryocyte-érythrocyte ; CFU-E : *colony-forming unit-erythroid* ; BFU-E : *burst-forming unit-erythroid*.

en augmentant les taux de BclX_L permet de contrôler l'apoptose et le clivage de GATA-1. Ainsi, en fonction des taux relatifs de Fas-L et d'Épo, les érythroblastes vont survivre et se différencier (Épo > Fas-L), vont survivre mais être bloqués dans leur maturation (Fas-L = Épo), ou vont entrer en apoptose et arrêter leur maturation (Fas-L > Épo).

La similitude de certains changements morphologiques s'opérant au cours de la différenciation érythroïde terminale et de l'apoptose (condensation nucléaire, condensation de la chromatine, condensation cytoplasmique, perte d'organites) nous a conduit à faire l'hypothèse que les caspases pourraient être également impliquées dans le processus de différenciation érythroblastique. Nous avons ainsi montré que la caspase-3 est activée par la caspase 9, probablement en raison d'une expression constitutive de Bax dans les érythroblastes (J. Vandekerckhove et G. Courtois, données non publiées), et que cette activation est nécessaire à la maturation terminale des érythroblastes [3]. Elle clive, comme au cours de l'apoptose, la lamine B et acinus (une protéine activée par clivage), entraînant respectivement la condensation du noyau et de la chromatine des érythroblastes. Cependant, contrairement à ce qui se produit au cours de l'apoptose, le facteur de transcription GATA-1 n'est pas clivé par la caspase-3 au cours de la différenciation érythroïde

terminale. Ainsi, la régulation de l'érythropoïèse est non seulement liée au niveau d'activation des caspases mais aussi, en aval de cette activation, à l'accessibilité de leurs cibles.

Hsp 70 protège GATA-1 de la dégradation

Pour expliquer les mécanismes régulant le choix entre apoptose et différenciation, nous avons fait l'hypothèse que la protéine de choc thermique Hsp70 pourrait être impliquée dans la régulation de l'accessibilité des caspases à leurs cibles. Les érythroblastes expriment de façon constitutive la protéine de choc thermique Hsp70. Cette protéine agit habituellement en chaperonnant les protéines dénaturées par la chaleur pour leur permettre de reprendre leur conformation native. Au cours de la différenciation érythroblastique, Hsp70 est exprimée de façon constitutive et se localise dans le noyau où elle interagit avec GATA-1. À ce niveau, elle protège ce facteur du clivage par la caspase-3 [4]. En accord avec le rôle d'Hsp70 comme protéine protectrice de GATA-1, le sevrage en Épo, qui induit l'apoptose, s'accompagne de la sortie nucléaire d'Hsp70, ce qui permet alors à la caspase 3 de cliver GATA-1 et d'induire une augmentation de l'activation des caspases et l'apoptose. Ainsi, l'Épo protège les cellules érythroïdes en cours de différenciation du clivage de GATA-1 par

la caspase-3 en assurant le maintien de la localisation nucléaire de Hsp70. Il reste à élucider les mécanismes par lesquels l'Épo induit la rétention d'Hsp70 dans le noyau, et pourquoi l'ADN n'est pas clivé au cours de la différenciation érythroïde. Dans le modèle que nous proposons, les caspases seraient activées au cours de la différenciation érythroïde et sont indispensables à la maturation terminale. Le devenir de l'érythroblaste, entre différenciation et apoptose, ne serait plus uniquement sous le contrôle du niveau d'activation des caspases, mais aussi sous le contrôle de l'expression et de la localisation nucléaire d'Hsp70. L'expression d'Hsp70 pourrait être sous le contrôle de GATA-1, mais aussi de l'hypoxie, ce qui constituerait un niveau supplémentaire de contrôle des globules rouges au niveau médullaire [5]. Ce système à la fois complexe mais rapide permettrait de réguler de façon fine et coordonnée le taux de fabrication des globules rouges simplement en contrôlant le passage nucléocytoplasmique d'Hsp70.

Un rôle plus large pour Hsp70 dans le processus tumoral ?

Ce modèle pourrait s'appliquer à d'autres types cellulaires nécessitant l'activation des caspases pour leur différenciation terminale comme les kératinocytes, les cellules du cristallin, les cellules musculaires, les mégacaryocytes lors de la formation des proplaquettes ou encore les monocytes lors de leur différenciation en macrophages [5, 6, 7-10].

La compréhension des mécanismes d'expression constitutive d'Hsp70 au cours de l'érythropoïèse, et des processus de signalisation par lesquels le récepteur de l'Épo induit la localisation nucléaire d'Hsp70, pourrait apporter des éclaircissements sur les mécanismes de diverses pathologies érythroïdes, telles que certaines polyglobulies ou à l'inverse certaines myélodysplasies. En effet, dans les polyglobulies qui ne sont pas associées à des mutations de la kinase Jak2 [11], une activation constitutive de la voie de signalisation responsable du maintien d'Hsp70

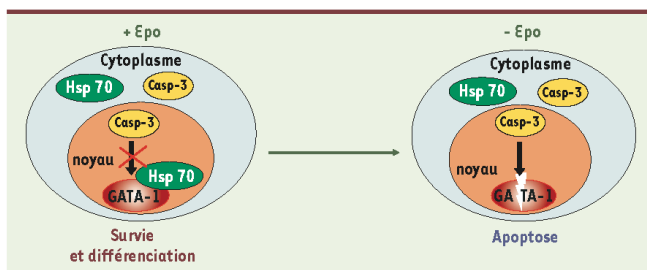


Figure 2. Modèle de la protection de GATA-1 du clivage par la caspase-3 par Hsp70 au cours de la différenciation érythroblastique. L'Épo permet le maintien de la localisation nucléaire d'Hsp70, ce qui protège GATA-1 du clivage par la caspase-3. En l'absence d'Épo, Hsp70 est délocalisée vers le cytoplasme et la caspase-3 peut alors cliver GATA-1, ce qui entraîne l'arrêt de différenciation et l'apoptose des progéniteurs érythroblastiques.

pourrait conduire à une polyglobulie sans doute d'intensité atténuée par rapport au phénotype observé dans la maladie de Vaquez. Dans les myélodysplasies, une sortie anormale d'Hsp70 du noyau pourrait expliquer le tableau biologique des formes de bas grade caractérisées par un arrêt prématuré de la différenciation et une augmentation de l'apoptose alors que la prolifération est consignée.

Par ailleurs, nos résultats pourraient également s'appliquer à d'autres hémopathies malignes et cancers qui ne touchent pas seulement l'érythropoïèse. Par exemple, il a été montré que les blastes de patients atteints de LMC (leucémie myéloïde chronique) résistant au traitement par l'imatinib (Glivec[®]) (un inhibiteur de tyrosine kinase bloquant l'activité catalytique de bcr-abl) surexpriment Hsp70 [12] par un mécanisme restant à élucider. L'inhibition de l'expression et/

ou de la localisation nucléaire d'Hsp70 pourrait, dans cette hypothèse, rétablir la sensibilité au Glivec[®]. De même l'hyper-expression d'Hsp70 explique la résistance aux drogues de certains cancers notamment du sein [13].

Hsp 70, lifesaver of GATA-1 during erythroid differentiation

RÉFÉRENCES

- Shawson SG, Sieltz CA, Hang X, et al. Purification of fetal hematopoietic progenitors and demonstration of recombinant multipotential colony-stimulating activity. *J Clin Invest* 1985 ; 75 : 1285-90.
- De Maria R, Zeman A, Shano A, et al. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 1997 ; 401 : 483-85.
- Dermati X, Gamito C, Amelkhem S, et al. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* 2001 ; 193 : 247-54.
- Ribal J, Dermati Y, Vandendriehove J, et al. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 2007 ; 446 : 102-5.
- Hang X, Xu C, Hang X, et al. Heat shock response and mammal adaptation to high elevation (eposoid). *Sci China C (Life Sci)* 2005 ; 48 : 500-12.
- Zandy AJ, Lakhani S, Zheng Y, et al. Role of the executioner caspases during lens development. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 30233-72.
- Ikeda R, Yotida K, Uchiyama H, et al. The small heat shock protein alphaB-crystallin inhibits differentiation-induced caspase-3 activation and myogenic differentiation. *Biol Pharm Bull* 2005 ; 53 : 1815-9.
- DeBotton S, Sabri S, Douglas E, et al. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood* 2002 ; 100 : 1330-7.
- Sordeto R, Rabec C, Marchetti S, et al. Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood* 2002 ; 100 : 4445-53.
- Cathelin S, Rabec C, Haddouji L, et al. Identification of proteins cleaved downstream of caspase activation in monocytes undergoing macrophage differentiation. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 17777-88.
- Ugo V, James C, Vaidyanathan H. Une mutation unique de la protéine kinase JH2 dans la polyglobulie de Vaquez et les syndromes myéloprolifératifs non-LMC. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 657-70.
- Pooley H, Lagarde V, Stienne G, et al. Overexpression of the heat shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 2007 ; 21 : 37-101.
- Groco ER, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Crit Stress Chaperones* 2005 ; 10 : 85-103.



Références bibliographiques

1. Iscove NN. The role of erythropoietin in regulation of population size and cell cycling of early and late erythroid precursors in mouse bone marrow. *Cell Tissue Kinet.* 1977;10:323-334.
2. Emerson SG, Sieff CA, Wang EA, Wong GG, Clark SC, Nathan DG. Purification of fetal hematopoietic progenitors and demonstration of recombinant multipotential colony-stimulating activity. *J Clin Invest.* 1985;76:1286-1290.
3. Gregory CJ, Eaves AC. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood.* 1978;51:527-537.
4. Iscove NN, Sieber F, Winterhalter KH. Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow: analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-concanavalin A. *J Cell Physiol.* 1974;83:309-320.
5. Alter BP. Biology of erythropoiesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;731:36-47.
6. Schroit AJ, Madsen JW, Tanaka Y. In vivo recognition and clearance of red blood cells containing phosphatidylserine in their plasma membranes. *J Biol Chem.* 1985;260:5131-5138.
7. Koury MJ, Sawyer ST, Brandt SJ. New insights into erythropoiesis. *Curr Opin Hematol.* 2002;9:93-100.
8. Pevny L, Simon MC, Robertson E, et al. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature.* 1991;349:257-260.
9. Tsang AP, Visvader JE, Turner CA, et al. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell.* 1997;90:109-119.
10. Wall L, deBoer E, Grosveld F. The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. *Genes Dev.* 1988;2:1089-1100.
11. Evans T, Reitman M, Felsenfeld G. An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:5976-5980.
12. Pevny L, Lin CS, D'Agati V, Simon MC, Orkin SH, Costantini F. Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development.* 1995;121:163-172.
13. Weiss MJ, Keller G, Orkin SH. Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev.* 1994;8:1184-1197.
14. Weiss MJ, Orkin SH. Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:9623-9627.
15. Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:12355-12358.
16. Takahashi S, Onodera K, Motohashi H, et al. Arrest in primitive erythroid cell development caused by promoter-specific disruption of the GATA-1 gene. *J Biol Chem.* 1997;272:12611-12615.
17. McDevitt MA, Shivdasani RA, Fujiwara Y, Yang H, Orkin SH. A "knockdown" mutation created by cis-element gene targeting reveals the dependence of erythroid cell maturation on the level of transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

1997;94:6781-6785.

18. Chiba T, Ikawa Y, Todokoro K. GATA-1 transactivates erythropoietin receptor gene, and erythropoietin receptor-mediated signals enhance GATA-1 gene expression. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:3843-3848.
19. Gregory T, Yu C, Ma A, Orkin SH, Blobel GA, Weiss MJ. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood.* 1999;94:87-96.
20. Evans T, Felsenfeld G. The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein. *Cell.* 1989;58:877-885.
21. Martin DI, Orkin SH. Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. *Genes Dev.* 1990;4:1886-1898.
22. Yang HY, Evans T. Distinct roles for the two cGATA-1 finger domains. *Mol Cell Biol.* 1992;12:4562-4570.
23. Whyatt DJ, deBoer E, Grosveld F. The two zinc finger-like domains of GATA-1 have different DNA binding specificities. *Embo J.* 1993;12:4993-5005.
24. Calligaris R, Bottardi S, Cogoi S, Apezteguia I, Santoro C. Alternative translation initiation site usage results in two functionally distinct forms of the GATA-1 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:11598-11602.
- 24bis Li Z, Godinho FJ, Klusmann JH, Garriga-Canut M, Yu C, Orkin SH. Developmental stage-selective effect of somatically mutated leukemogenic transcription factor GATA1. *Nat Genet.* 2005;37:613-619.
- 24ter Hollanda LM, Lima CS, Cunha AF, et al. An inherited mutation leading to production of only the short isoform of GATA-1 is associated with impaired erythropoiesis. *Nat Genet.* 2006;38:807-812.
25. Tsang AP, Fujiwara Y, Hom DB, Orkin SH. Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev.* 1998;12:1176-1188.
26. Liew CK, Simpson RJ, Kwan AH, et al. Zinc fingers as protein recognition motifs: structural basis for the GATA-1/friend of GATA interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:583-588.
27. Morceau F, Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M. GATA-1: friends, brothers, and coworkers. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1030:537-554.
28. Kosmider O, Denis N, Lacout C, Vainchenker W, Dubreuil P, Moreau-Gachelin F. Kit-activating mutations cooperate with Spi-1/PU.1 overexpression to promote tumorigenic progression during erythroleukemia in mice. *Cancer Cell.* 2005;8:467-478.
29. Coulon S, Vandekerckhove J, Dussiot M, et al. Human erythroleukemia: is the two-hit model of mouse leukemogenesis valid in human disease? *Leukemia.* 2007;21:2212-2214.
30. Orkin SH. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood.* 1992;80:575-581.
31. Rylski M, Welch JJ, Chen YY, et al. GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation. *Mol Cell Biol.* 2003;23:5031-5042.
32. Zon LI, Youssoufian H, Mather C, Lodish HF, Orkin SH. Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:10638-10641.
33. Imagawa S, Yamamoto M, Miura Y. Negative regulation of the erythropoietin gene expression by the GATA transcription factors. *Blood.* 1997;89:1430-1439.
34. Imagawa S, Suzuki N, Ohmine K, et al. GATA suppresses erythropoietin gene expression through GATA site in mouse erythropoietin gene promoter. *Int J Hematol.* 2002;75:376-381.
35. Hafid-Medheb K, Augery-Bourget Y, Minatchy MN, Hanania N, Robert-Lezenes J. Bcl-XL is required for heme synthesis during the chemical induction of erythroid

- differentiation of murine erythroleukemia cells independently of its antiapoptotic function. *Blood*. 2003;101:2575-2583.
36. Motoyama N, Wang F, Roth KA, et al. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science*. 1995;267:1506-1510.
 37. Wagner KU, Claudio E, Rucker EB, 3rd, et al. Conditional deletion of the Bcl-x gene from erythroid cells results in hemolytic anemia and profound splenomegaly. *Development*. 2000;127:4949-4958.
 38. Shirihai OS, Gregory T, Yu C, Orkin SH, Weiss MJ. ABC-me: a novel mitochondrial transporter induced by GATA-1 during erythroid differentiation. *Embo J*. 2000;19:2492-2502.
 39. Grass JA, Boyer ME, Pal S, Wu J, Weiss MJ, Bresnick EH. 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*. 2003;100:8811-8816.
 40. Wechsler J, Greene M, McDevitt MA, et al. Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet*. 2002;32:148-152.
 41. Tsai SF, Strauss E, Orkin SH. Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter. *Genes Dev*. 1991;5:919-931.
 42. Leonard M, Brice M, Engel JD, Papayannopoulou T. Dynamics of GATA transcription factor expression during erythroid differentiation. *Blood*. 1993;82:1071-1079.
 43. Martin DI, Zon LI, Mutter G, Orkin SH. Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. *Nature*. 1990;344:444-447.
 44. Romeo PH, Prandini MH, Joulin V, et al. Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature*. 1990;344:447-449.
 45. Zon LI, Yamaguchi Y, Yee K, et al. Expression of mRNA for the GATA-binding proteins in human eosinophils and basophils: potential role in gene transcription. *Blood*. 1993;81:3234-3241.
 - 45bis. Ito, E., Toki, T., Ishihara, H., et al. Erythroid transcription factor GATA-1 is abundantly transcribed in mouse testis. *Nature*. 1993;362 :466-468.
 46. Whyatt D, Lindeboom F, Karis A, et al. An intrinsic but cell-nonautonomous defect in GATA-1-overexpressing mouse erythroid cells. *Nature*. 2000;406:519-524.
 47. Boyes J, Byfield P, Nakatani Y, Ogryzko V. Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature*. 1998;396:594-598.
 48. Hung HL, Lau J, Kim AY, Weiss MJ, Blobel GA. CREB-Binding protein acetylates hematopoietic transcription factor GATA-1 at functionally important sites. *Mol Cell Biol*. 1999;19:3496-3505.
 49. Blobel GA, Nakajima T, Eckner R, Montminy M, Orkin SH. CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:2061-2066.
 50. Lamonica JM, Vakoc CR, Blobel GA. Acetylation of GATA-1 is required for chromatin occupancy. *Blood*. 2006;108:3736-3738.
 51. Crossley M, Orkin SH. Phosphorylation of the erythroid transcription factor GATA-1. *J Biol Chem*. 1994;269:16589-16596.
 52. Rooke HM, Orkin SH. Phosphorylation of Gata1 at serine residues 72, 142, and 310 is not essential for hematopoiesis in vivo. *Blood*. 2006;107:3527-3530.
 53. Partington GA, Patient RK. Phosphorylation of GATA-1 increases its DNA-binding affinity and is correlated with induction of human K562 erythroleukaemia cells. *Nucleic Acids Res*. 1999;27:1168-1175.
 54. Towatari M, Ciro M, Ottolenghi S, Tsuzuki S, Enver T. Involvement of mitogen-activated protein kinase in the cytokine-regulated phosphorylation of transcription factor GATA-1. *Hematol J*. 2004;5:262-272.
 55. Yu YL, Chiang YJ, Chen YC, et al. MAPK-mediated phosphorylation of GATA-1

- promotes Bcl-XL expression and cell survival. *J Biol Chem.* 2005;280:29533-29542.
56. Zhao W, Kitidis C, Fleming MD, Lodish HF, Ghaffari S. Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood.* 2006;107:907-915.
57. Sapetschnig A, Rischitor G, Braun H, et al. Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *Embo J.* 2002;21:5206-5215.
58. Collavin L, Gostissa M, Avolio F, et al. Modification of the erythroid transcription factor GATA-1 by SUMO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:8870-8875.
59. Orkin SH. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet.* 2000;1:57-64.
60. Hernandez-Hernandez A, Ray P, Litos G, et al. Acetylation and MAPK phosphorylation cooperate to regulate the degradation of active GATA-1. *Embo J.* 2006;25:3264-3274.
61. Newton A, Mackay J, Crossley M. The N-terminal zinc finger of the erythroid transcription factor GATA-1 binds GATC motifs in DNA. *J Biol Chem.* 2001;276:35794-35801.
62. Birkmann J, Oez S, Smetak M, Kaiser G, Kappauf H, Gallmeier WM. Effects of recombinant human thrombopoietin alone and in combination with erythropoietin and early-acting cytokines on human mobilized purified CD34+ progenitor cells cultured in serum-depleted medium. *Stem Cells.* 1997;15:18-32.
- 62 bis Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2005;13:205-220.
63. Nocka K, Majumder S, Chabot B, et al. Expression of c-kit gene products in known cellular targets of W mutations in normal and W mutant mice--evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice. *Genes Dev.* 1989;3:816-826.
64. Russell ES. Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv Genet.* 1979;20:357-459.
65. Broudy VC. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood.* 1997;90:1345-1364.
66. Langley KE, Bennett LG, Wypych J, et al. Soluble stem cell factor in human serum. *Blood.* 1993;81:656-660.
67. Abkowitz JL, Hume H, Yancik SA, Bennett LG, Matsumoto AM. Stem cell factor serum levels may not be clinically relevant. *Blood.* 1996;87:4017-4018.
68. Flanagan JG, Chan DC, Leder P. Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant. *Cell.* 1991;64:1025-1035.
69. Brannan CI, Lyman SD, Williams DE, et al. Steel-Dickie mutation encodes a c-kit ligand lacking transmembrane and cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:4671-4674.
70. Miyazawa K, Williams DA, Gotoh A, Nishimaki J, Broxmeyer HE, Toyama K. Membrane-bound Steel factor induces more persistent tyrosine kinase activation and longer life span of c-kit gene-encoded protein than its soluble form. *Blood.* 1995;85:641-649.
71. Ronnstrand L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:2535-2548.
72. Ashman LK, Cambareri AC, To LB, Levinsky RJ, Juttner CA. Expression of the YB5.B8 antigen (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow. *Blood.* 1991;78:30-37.
73. Broudy VC, Lin N, Zsebo KM, et al. Isolation and characterization of a monoclonal antibody that recognizes the human c-kit receptor. *Blood.* 1992;79:338-346.
74. Ogawa M, Matsuzaki Y, Nishikawa S, et al. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med.* 1991;174:63-71.

75. Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, et al. Enrichment and characterization of murine hematopoietic stem cells that express c-kit molecule. *Blood*. 1991;78:1706-1712.
76. Bridgell RA, Broudy VC, Bruno E, Brandt JE, Srouf EF, Hoffman R. Further phenotypic characterization and isolation of human hematopoietic progenitor cells using a monoclonal antibody to the c-kit receptor. *Blood*. 1992;79:3159-3167.
77. Uoshima N, Ozawa M, Kimura S, et al. Changes in c-Kit expression and effects of SCF during differentiation of human erythroid progenitor cells. *Br J Haematol*. 1995;91:30-36.
78. Muta K, Krantz SB, Bondurant MC, Dai CH. Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation. *Blood*. 1995;86:572-580.
79. Brugger W, Mocklin W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L. Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34+ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, IL-3, interferon-gamma, and erythropoietin. *Blood*. 1993;81:2579-2584.
80. Wu H, Klingmuller U, Besmer P, Lodish HF. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature*. 1995;377:242-246.
81. Lee JW, Gersuk GM, Kiener PA, Beckham C, Ledbetter JA, Deeg HJ. HLA-DR-triggered inhibition of hemopoiesis involves Fas/Fas ligand interactions and is prevented by c-kit ligand. *J Immunol*. 1997;159:3211-3219.
82. Nishio M, Oda A, Koizumi K, et al. Stem cell factor prevents Fas-mediated apoptosis of human erythroid precursor cells with Src-family kinase dependency. *Exp Hematol*. 2001;29:19-29.
83. Heinrich MC, Blanke CD, Druker BJ, Corless CL. Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol*. 2002;20:1692-1703.
84. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:10560-10564.
85. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *Embo J*. 1987;6:3341-3351.
86. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*. 1990;61:203-212.
87. Roskoski R, Jr. Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;337:1-13.
88. Gommerman JL, Sittaro D, Klebasz NZ, Williams DA, Berger SA. Differential stimulation of c-Kit mutants by membrane-bound and soluble Steel Factor correlates with leukemic potential. *Blood*. 2000;96:3734-3742.
89. Serve H, Yee NS, Stella G, Sepp-Lorenzino L, Tan JC, Besmer P. Differential roles of PI3-kinase and Kit tyrosine 821 in Kit receptor-mediated proliferation, survival and cell adhesion in mast cells. *Embo J*. 1995;14:473-483.
90. Lennartsson J, Blume-Jensen P, Hermanson M, Ponten E, Carlberg M, Ronnstrand L. 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*. 1999;18:5546-5553.
91. Linnekin D, DeBerry CS, Mou S. Lyn associates with the juxtamembrane region of c-Kit and is activated by stem cell factor in hematopoietic cell lines and normal progenitor cells. *J Biol Chem*. 1997;272:27450-27455.
92. Timokhina I, Kissel H, Stella G, Besmer P. Kit signaling through PI 3-kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation.

- Embo J. 1998;17:6250-6262.
93. Ueda S, Mizuki M, Ikeda H, et al. Critical roles of c-Kit tyrosine residues 567 and 719 in stem cell factor-induced chemotaxis: contribution of src family kinase and PI3-kinase on calcium mobilization and cell migration. *Blood*. 2002;99:3342-3349.
 94. Thommes K, Lennartsson J, Carlberg M, Ronnstrand L. Identification of Tyr-703 and Tyr-936 as the primary association sites for Grb2 and Grb7 in the c-Kit/stem cell factor receptor. *Biochem J*. 1999;341 (Pt 1):211-216.
 95. Lorenz U, Bergemann AD, Steinberg HN, et al. Genetic analysis reveals cell type-specific regulation of receptor tyrosine kinase c-Kit by the protein tyrosine phosphatase SHP1. *J Exp Med*. 1996;184:1111-1126.
 96. Kozlowski M, Larose L, Lee F, Le DM, Rottapel R, Siminovitch KA. SHP-1 binds and negatively modulates the c-Kit receptor by interaction with tyrosine 569 in the c-Kit juxtamembrane domain. *Mol Cell Biol*. 1998;18:2089-2099.
 97. Tauchi T, Feng GS, Marshall MS, et al. The ubiquitously expressed Syp phosphatase interacts with c-kit and Grb2 in hematopoietic cells. *J Biol Chem*. 1994;269:25206-25211.
 98. Huber M, Helgason CD, Damen JE, Liu L, Humphries RK, Krystal G. The src homology 2-containing inositol phosphatase (SHIP) is the gatekeeper of mast cell degranulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:11330-11335.
 99. Weiss MJ, Yu C, Orkin SH. Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line. *Mol Cell Biol*. 1997;17:1642-1651.
 100. Tan BL, 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*. 2003;278:11686-11695.
 101. Agosti V, Karur V, Sathyanarayana P, Besmer P, Wojchowski DM. A KIT juxtamembrane PY567 -directed pathway provides nonredundant signals for erythroid progenitor cell development and stress erythropoiesis. *Exp Hematol*. 2009;37:159-171.
 102. Hong L, Munugalavadla V, Kapur R. c-Kit-mediated overlapping and unique functional and biochemical outcomes via diverse signaling pathways. *Mol Cell Biol*. 2004;24:1401-1410.
 103. Wandzioch E, Edling CE, Palmer RH, 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*. 2004;104:51-57.
 104. Edling CE, Pedersen M, Carlsson L, Ronnstrand L, Palmer RH, Hallberg B. Haematopoietic progenitor cells utilise conventional PKC to suppress PKB/Akt activity in response to c-Kit stimulation. *Br J Haematol*. 2007;136:260-268.
 105. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*. 1995;83:59-67.
 106. Kelley LL, Koury MJ, Bondurant MC, Koury ST, Sawyer ST, Wickrema A. Survival or death of individual proerythroblasts results from differing erythropoietin sensitivities: a mechanism for controlled rates of erythrocyte production. *Blood*. 1993;82:2340-2352.
 107. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*. 1985;313:806-810.
 108. Shaskey DJ, Green GA. Sports haematology. *Sports Med*. 2000;29:27-38.
 109. Constantinescu SN, Ghaffari S, Lodish HF. The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction. *Trends Endocrinol Metab*. 1999;10:18-23.
 110. Rane SG, Reddy EP. JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene*. 2002;21:3334-3358.
 111. Yu X, Shacka JJ, Eells JB, et al. Erythropoietin receptor signalling is required for

- normal brain development. *Development*. 2002;129:505-516.
112. Suzuki N, Ohneda O, Takahashi S, et al. Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality. *Blood*. 2002;100:2279-2288.
113. D'Andrea AD, Lodish HF, Wong GG. Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell*. 1989;57:277-285.
114. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*. 1993;74:227-236.
115. Parganas E, Wang D, Stravopodis D, et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell*. 1998;93:385-395.
116. Neubauer H, Cumano A, Muller M, Wu H, Huffstadt U, Pfeffer K. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell*. 1998;93:397-409.
- 116bis. de la Chapelle A, Traskelin AL, Juvonen E. Truncated erythropoietin receptor causes dominantly inherited benign human erythrocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:4495-4499.
117. Sokol L, Luhovy M, Guan Y, Prchal JF, Semenza GL, Prchal JT. Primary familial polycythemia: a frameshift mutation in the erythropoietin receptor gene and increased sensitivity of erythroid progenitors to erythropoietin. *Blood*. 1995;86:15-22.
118. Longmore GD, Lodish HF. An activating mutation in the murine erythropoietin receptor induces erythroleukemia in mice: a cytokine receptor superfamily oncogene. *Cell*. 1991;67:1089-1102.
- 118bis. Zang H, Sato K, Nakajima H, McKay C, Ney PA, Ihle JN. The distal region and receptor tyrosines of the Epo receptor are non-essential for in vivo erythropoiesis. *Embo J*. 2001;20:3156-3166.
- 118ter. Menon MP, Fang J, Wojchowski DM. Core erythropoietin receptor signals for late erythroblast development. *Blood*. 2006;107:2662-2672.
119. Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol*. 2000;20:3387-3395.
120. Feng J, Witthuhn BA, Matsuda T, Kohlhuber F, Kerr IM, Ihle JN. Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol Cell Biol*. 1997;17:2497-2501.
121. Argetsinger LS, Kouadio JL, Steen H, Stensballe A, Jensen ON, Carter-Su C. Autophosphorylation of JAK2 on tyrosines 221 and 570 regulates its activity. *Mol Cell Biol*. 2004;24:4955-4967.
122. Feener EP, Rosario F, Dunn SL, Stancheva Z, Myers MG, Jr. Tyrosine phosphorylation of Jak2 in the JH2 domain inhibits cytokine signaling. *Mol Cell Biol*. 2004;24:4968-4978.
123. Halupa A, Bailey ML, Huang K, Iscove NN, Levy DE, Barber DL. A novel role for STAT1 in regulating murine erythropoiesis: deletion of STAT1 results in overall reduction of erythroid progenitors and alters their distribution. *Blood*. 2005;105:552-561.
124. Wierenga AT, Vogelzang I, Eggen BJ, Vellenga E. Erythropoietin-induced serine 727 phosphorylation of STAT3 in erythroid cells is mediated by a MEK-, ERK-, and MSK1-dependent pathway. *Exp Hematol*. 2003;31:398-405.
125. Wojchowski DM, Gregory RC, Miller CP, Pandit AK, Pircher TJ. Signal transduction in the erythropoietin receptor system. *Exp Cell Res*. 1999;253:143-156.
126. Cheung JY, Miller BA. Molecular mechanisms of erythropoietin signaling. *Nephron*. 2001;87:215-222.
127. Teglund S, McKay C, Schuetz E, et al. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell*. 1998;93:841-850.
128. Dolznig H, Grebien F, Deiner EM, et al. Erythroid progenitor renewal versus

- differentiation: genetic evidence for cell autonomous, essential functions of EpoR, Stat5 and the GR. *Oncogene*. 2006;25:2890-2900.
129. Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, Brugnara C, Lodish HF. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell*. 1999;98:181-191.
130. Socolovsky M, Nam H, Fleming MD, Haase VH, Brugnara C, Lodish HF. Ineffective erythropoiesis in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood*. 2001;98:3261-3273.
131. Li K, Menon MP, Karur VG, Hegde S, Wojchowski DM. Attenuated signaling by a phosphotyrosine-null Epo receptor form in primary erythroid progenitor cells. *Blood*. 2003;102:3147-3153.
132. Grebien F, Kerenyi MA, Kovacic B, et al. Stat5 activation enables erythropoiesis in the absence of EpoR and Jak2. *Blood*. 2008;111:4511-4522.
133. Grillot DA, Gonzalez-Garcia M, Ekhterae D, et al. Genomic organization, promoter region analysis, and chromosome localization of the mouse bcl-x gene. *J Immunol*. 1997;158:4750-4757.
134. Silva M, Benito A, Sanz C, et al. Erythropoietin can induce the expression of bcl-x(L) through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines. *J Biol Chem*. 1999;274:22165-22169.
135. Dolznig H, Habermann B, Stangl K, et al. Apoptosis protection by the Epo target Bcl-X(L) allows factor-independent differentiation of primary erythroblasts. *Curr Biol*. 2002;12:1076-1085.
136. Sathyanarayana P, Dev A, Fang J, et al. EPO receptor circuits for primary erythroblast survival. *Blood*. 2008;111:5390-5399.
137. Menon MP, Karur V, Bogacheva O, Bogachev O, Cuetara B, Wojchowski DM. Signals for stress erythropoiesis are integrated via an erythropoietin receptor-phosphotyrosine-343-Stat5 axis. *J Clin Invest*. 2006;116:683-694.
138. Chida D, Miura O, Yoshimura A, Miyajima A. Role of cytokine signaling molecules in erythroid differentiation of mouse fetal liver hematopoietic cells: functional analysis of signaling molecules by retrovirus-mediated expression. *Blood*. 1999;93:1567-1578.
139. Fang J, Menon M, Kapelle W, et al. EPO modulation of cell-cycle regulatory genes, and cell division, in primary bone marrow erythroblasts. *Blood*. 2007;110:2361-2370.
140. Brown MT, Cooper JA. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1287:121-149.
141. Hibbs ML, Dunn AR. Lyn, a src-like tyrosine kinase. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997;29:397-400.
- 141bis. Corey SJ, Anderson SM. Src-related protein tyrosine kinases in hematopoiesis. *Blood*. 1999;93:1-14.
142. De Franceschi L, Fumagalli L, Olivieri O, Corrocher R, Lowell CA, Berton G. Deficiency of Src family kinases Fgr and Hck results in activation of erythrocyte K/C1 cotransport. *J Clin Invest*. 1997;99:220-227.
143. Robinson D, Chen HC, Li D, et al. Tyrosine kinase expression profiles of chicken erythro-progenitor cells and oncogene-transformed erythroblasts. *J Biomed Sci*. 1998;5:93-100.
144. Musch MW, Hubert EM, Goldstein L. Volume expansion stimulates p72(syk) and p56(lyn) in skate erythrocytes. *J Biol Chem*. 1999;274:7923-7928.
145. Yi TL, Bolen JB, Ihle JN. Hematopoietic cells express two forms of lyn kinase differing by 21 amino acids in the amino terminus. *Mol Cell Biol*. 1991;11:2391-2398.
146. Tilbrook PA, Ingleby E, Williams JH, Hibbs ML, Klinken SP. Lyn tyrosine kinase is essential for erythropoietin-induced differentiation of J2E erythroid cells. *Embo J*. 1997;16:1610-1619.

147. Ingley E, McCarthy DJ, Pore JR, et al. Lyn deficiency reduces GATA-1, EKLf and STAT5, and induces extramedullary stress erythropoiesis. *Oncogene*. 2005;24:336-343.
148. Karur VG, Lowell CA, Besmer P, Agosti V, Wojchowski DM. Lyn kinase promotes erythroblast expansion and late-stage development. *Blood*. 2006;108:1524-1532.
149. Kosmider O, Buet D, Gallais I, Denis N, Moreau-Gachelin F. Erythropoietin down-regulates stem cell factor receptor (Kit) expression in the leukemic proerythroblast: role of Lyn kinase. *PLoS One*. 2009;4:e5721.
150. Okutani Y, Kitanaka A, Tanaka T, et al. Src directly tyrosine-phosphorylates STAT5 on its activation site and is involved in erythropoietin-induced signaling pathway. *Oncogene*. 2001;20:6643-6650.
151. Kitanaka A, Waki M, Kamano H, et al. Antisense src expression inhibits proliferation and erythropoietin-induced erythroid differentiation of K562 human leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;201:1534-1540.
152. Kubota Y, Tanaka T, Kitanaka A, et al. Src transduces erythropoietin-induced differentiation signals through phosphatidylinositol 3-kinase. *Embo J*. 2001;20:5666-5677.
153. Harashima A, Suzuki M, Okochi A, et al. CD45 tyrosine phosphatase inhibits erythroid differentiation of umbilical cord blood CD34+ cells associated with selective inactivation of Lyn. *Blood*. 2002;100:4440-4445.
154. Chin H, Arai A, Wakao H, Kamiyama R, Miyasaka N, Miura O. Lyn physically associates with the erythropoietin receptor and may play a role in activation of the Stat5 pathway. *Blood*. 1998;91:3734-3745.
155. Boudot C, Dasse E, Lambert E, et al. Involvement of the Src kinase Lyn in phospholipase C-gamma 2 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activation in Epo signalling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;300:437-442.
156. Bao H, Jacobs-Helber SM, Lawson AE, Penta K, Wickrema A, Sawyer ST. Protein kinase B (c-Akt), phosphatidylinositol 3-kinase, and STAT5 are activated by erythropoietin (EPO) in HCD57 erythroid cells but are constitutively active in an EPO-independent, apoptosis-resistant subclone (HCD57-SREI cells). *Blood*. 1999;93:3757-3773.
157. Huddleston H, Tan B, Yang FC, et al. Functional p85alpha gene is required for normal murine fetal erythropoiesis. *Blood*. 2003;102:142-145.
158. Kashii Y, Uchida M, Kirito K, et al. A member of Forkhead family transcription factor, FKHL1, is one of the downstream molecules of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt activation pathway in erythropoietin signal transduction. *Blood*. 2000;96:941-949.
159. Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science*. 2003;301:215-218.
160. Bakker WJ, Blazquez-Domingo M, Kolbus A, et al. FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1. *J Cell Biol*. 2004;164:175-184.
161. Bouscary D, Pene F, Claessens YE, et al. Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. *Blood*. 2003;101:3436-3443.
162. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999;96:857-868.
163. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:489-501.
164. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*. 2002;14:381-395.
165. Djordjevic S, Driscoll PC. Structural insight into substrate specificity and regulatory mechanisms of phosphoinositide 3-kinases. *Trends Biochem Sci*. 2002;27:426-432.
166. Fukuda S, Foster RG, Porter SB, Pelus LM. The antiapoptosis protein survivin is associated with cell cycle entry of normal cord blood CD34(+) cells and modulates cell cycle and proliferation of mouse hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2002;100:2463-2471.

167. Somervaille TC, Linch DC, Khwaja A. Growth factor withdrawal from primary human erythroid progenitors induces apoptosis through a pathway involving glycogen synthase kinase-3 and Bax. *Blood*. 2001;98:1374-1381.
168. Myklebust JH, Blomhoff HK, Rusten LS, Stokke T, Smeland EB. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is important for erythropoietin-induced erythropoiesis from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*. 2002;30:990-1000.
169. Ghaffari S, Kitidis C, Zhao W, 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*. 2006;107:1888-1891.
170. Tauchi T, Damen JE, Toyama K, Feng GS, Broxmeyer HE, Krystal G. Tyrosine 425 within the activated erythropoietin receptor binds Syp, reduces the erythropoietin required for Syp tyrosine phosphorylation, and promotes mitogenesis. *Blood*. 1996;87:4495-4501.
171. Barber DL, Corless CN, Xia K, Roberts TM, D'Andrea AD. Erythropoietin activates Raf1 by an Shc-independent pathway in CTLL-EPO-R cells. *Blood*. 1997;89:55-64.
172. Mason JM, Beattie BK, Liu Q, Dumont DJ, Barber DL. The SH2 inositol 5-phosphatase Ship1 is recruited in an SH2-dependent manner to the erythropoietin receptor. *J Biol Chem*. 2000;275:4398-4406.
173. Khalaf WF, White H, Wenning MJ, Orazi A, Kapur R, Ingram DA. K-Ras is essential for normal fetal liver erythropoiesis. *Blood*. 2005;105:3538-3541.
174. Haq R, Halupa A, Beattie BK, Mason JM, Zanke BW, Barber DL. Regulation of erythropoietin-induced STAT serine phosphorylation by distinct mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*. 2002;277:17359-17366.
175. Sui X, Krantz SB, You M, Zhao Z. Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis. *Blood*. 1998;92:1142-1149.
176. Jacobs-Helber SM, Sawyer ST. Jun N-terminal kinase promotes proliferation of immature erythroid cells and erythropoietin-dependent cell lines. *Blood*. 2004;104:696-703.
177. Tamura K, Sudo T, Senftleben U, Dadak AM, Johnson R, Karin M. Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell*. 2000;102:221-231.
178. Jacobs-Helber SM, Ryan JJ, Sawyer ST. JNK and p38 are activated by erythropoietin (EPO) but are not induced in apoptosis following EPO withdrawal in EPO-dependent HCD57 cells. *Blood*. 2000;96:933-940.
179. Witt O, Sand K, Pekrun A. Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways. *Blood*. 2000;95:2391-2396.
180. Nagata Y, Takahashi N, Davis RJ, Todokoro K. Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Blood*. 1998;92:1859-1869.
181. Uddin S, Ah-Kang J, Ulaszek J, Mahmud D, Wickrema A. Differentiation stage-specific activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms in primary human erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:147-152.
182. Khan WN, Sideras P, Rosen FS, Alt FW. The role of Bruton's tyrosine kinase in B-cell development and function in mice and man. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;764:27-38.
183. Conley ME, Rohrer J, Minegishi Y. X-linked agammaglobulinemia. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2000;19:183-204.
184. van Dijk TB, van Den Akker E, Amelsvoort MP, Mano H, Lowenberg B, von Lindern M. Stem cell factor induces phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent Lyn/Tec/Dok-1 complex formation in hematopoietic cells. *Blood*. 2000;96:3406-3413.
185. Schmidt U, van den Akker E, Parren-van Amelsvoort M, et al. Btk is required for an efficient response to erythropoietin and for SCF-controlled protection against TRAIL in

- erythroid progenitors. *J Exp Med*. 2004;199:785-795.
186. von Lindern M, Schmidt U, Beug H. Control of erythropoiesis by erythropoietin and stem cell factor: a novel role for Bruton's tyrosine kinase. *Cell Cycle*. 2004;3:876-879.
187. Myers MP, Andersen JN, Cheng A, et al. TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem*. 2001;276:47771-47774.
188. Neel BG, Gu H, Pao L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci*. 2003;28:284-293.
189. Klingmuller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell*. 1995;80:729-738.
190. Yoshimura A, Ohkubo T, Kiguchi T, et al. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *Embo J*. 1995;14:2816-2826.
191. Starr R, Willson TA, Viney EM, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*. 1997;387:917-921.
192. Ungureanu D, Saharinen P, Junttila I, Hilton DJ, Silvennoinen O. Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1. *Mol Cell Biol*. 2002;22:3316-3326.
193. Erneux C, Govaerts C, Communi D, Pessesse X. The diversity and possible functions of the inositol polyphosphate 5-phosphatases. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1436:185-199.
194. Helgason CD, Damen JE, Rosten P, et al. Targeted disruption of SHIP leads to hemopoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span. *Genes Dev*. 1998;12:1610-1620.
195. Bogacheva O, Bogachev O, Menon M, et al. DYRK3 dual-specificity kinase attenuates erythropoiesis during anemia. *J Biol Chem*. 2008;283:36665-36675.
196. Fang J, Menon M, Zhang D, et al. Attenuation of EPO-dependent erythroblast formation by death-associated protein kinase-2. *Blood*. 2008;112:886-890.
197. Jacobs-Helber SM, Penta K, Sun Z, Lawson A, Sawyer ST. Distinct signaling from stem cell factor and erythropoietin in HCD57 cells. *J Biol Chem*. 1997;272:6850-6853.
198. Kapur R, Majumdar M, Xiao X, McAndrews-Hill M, Schindler K, Williams DA. Signaling through the interaction of membrane-restricted stem cell factor and c-kit receptor tyrosine kinase: genetic evidence for a differential role in erythropoiesis. *Blood*. 1998;91:879-889.
199. Wu H, Klingmuller U, Acurio A, Hsiao JG, Lodish HF. Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:1806-1810.
200. Broudy VC, Lin NL, Buhring HJ, Komatsu N, Kavanagh TJ. Analysis of c-kit receptor dimerization by fluorescence resonance energy transfer. *Blood*. 1998;91:898-906.
201. Li K, Miller C, Hegde S, Wojchowski D. Roles for an Epo receptor Tyr-343 Stat5 pathway in proliferative co-signaling with kit. *J Biol Chem*. 2003;278:40702-40709.
202. Hong L, Ramdas B, Chen J, Harris C, Wojchowski DM, Kapur R. KIT associated intracellular tyrosines play an essential role in EpoR co-signaling. *Cell Signal*. 2008;20:1513-1520.
203. 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;130:121-129.
204. 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*. 2001;276:1099-1106.
205. Sato T, Watanabe S, Ishii E, Tsuji K, Nakahata T. Induction of the erythropoietin

- receptor gene and acquisition of responsiveness to erythropoietin by stem cell factor in HML/SE, a human leukemic cell line. *J Biol Chem.* 1998;273:16921-16926.
206. Miller CP, Heilman DW, Wojchowski DM. Erythropoietin receptor-dependent erythroid colony-forming unit development: capacities of Y343 and phosphotyrosine-null receptor forms. *Blood.* 2002;99:898-904.
207. Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, Plzak L. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature.* 1957;179:633-634.
208. Erslev AJ, Caro J, Miller O, Silver R. Plasma erythropoietin in health and disease. *Ann Clin Lab Sci.* 1980;10:250-257.
209. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *Faseb J.* 2002;16:1151-1162.
210. Schuster SJ, Badiavas EV, Costa-Giomi P, Weinmann R, Erslev AJ, Caro J. Stimulation of erythropoietin gene transcription during hypoxia and cobalt exposure. *Blood.* 1989;73:13-16.
211. Goldberg MA, Gaut CC, Bunn HF. Erythropoietin mRNA levels are governed by both the rate of gene transcription and posttranscriptional events. *Blood.* 1991;77:271-277.
212. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 1992;12:5447-5454.
213. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* 2001;292:468-472.
214. Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science.* 2001;292:464-468.
215. Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS. HIF-1 α binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:9630-9635.
216. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science.* 2002;295:858-861.
217. Sang N, Fang J, Srinivas V, Leshchinsky I, Caro J. Carboxyl-terminal transactivation activity of hypoxia-inducible factor 1 α is governed by a von Hippel-Lindau protein-independent, hydroxylation-regulated association with p300/CBP. *Mol Cell Biol.* 2002;22:2984-2992.
218. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem.* 1997;272:22642-22647.
219. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:647-656.
220. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* 1999;397:441-446.
221. Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett.* 2000;476:118-123.
222. Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:420-430.
223. Hanspal M. Importance of cell-cell interactions in regulation of erythropoiesis. *Curr Opin Hematol.* 1997;4:142-147.
224. De Maria R, Testa U, Luchetti L, et al. Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood.* 1999;93:796-803.
225. De Maria R, Zeuner A, Eramo A, et al. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature.* 1999;401:489-493.
226. Liu Y, Pop R, Sadegh C, Brugnara C, Haase VH, Socolovsky M. Suppression of Fas-

- FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. *Blood*. 2006;108:123-133.
227. Rubiolo C, Piazzolla D, Meissl K, et al. A balance between Raf-1 and Fas expression sets the pace of erythroid differentiation. *Blood*. 2006;108:152-159.
228. Carlile G, Smith DH, Wiedmann M. A non-apoptotic role for Fas/FasL in erythropoiesis. *FEBS Lett*. 2009.
229. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997;326 (Pt 1):1-16.
230. Gregoli PA, Bondurant MC. Function of caspases in regulating apoptosis caused by erythropoietin deprivation in erythroid progenitors. *J Cell Physiol*. 1999;178:133-143.
231. Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, et al. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med*. 2001;193:247-254.
232. Paddy MR, Belmont AS, Saumweber H, Agard DA, Sedat JW. Interphase nuclear envelope lamins form a discontinuous network that interacts with only a fraction of the chromatin in the nuclear periphery. *Cell*. 1990;62:89-106.
233. Takahashi A, Alnemri ES, Lazebnik YA, et al. Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:8395-8400.
234. Sahara S, Aoto M, Eguchi Y, Imamoto N, Yoneda Y, Tsujimoto Y. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature*. 1999;401:168-173.
235. Zamzami N, Kroemer G. Condensed matter in cell death. *Nature*. 1999;401:127-128.
236. Carlile GW, Smith DH, Wiedmann M. Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood*. 2004;103:4310-4316.
237. Kolbus A, Pilat S, Husak Z, et al. Raf-1 antagonizes erythroid differentiation by restraining caspase activation. *J Exp Med*. 2002;196:1347-1353.
238. De Botton S, Sabri S, Daugas E, et al. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood*. 2002;100:1310-1317.
239. Sordet O, Rebe C, Plenchette S, et al. Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood*. 2002;100:4446-4453.
240. Weil M, Raff MC, Braga VM. Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr Biol*. 1999;9:361-364.
241. Ishizaki Y, Jacobson MD, Raff MC. A role for caspases in lens fiber differentiation. *J Cell Biol*. 1998;140:153-158.
242. Posmantur R, Wang KK, Gilbertsen RB. Caspase-3-like activity is necessary for IL-2 release in activated Jurkat T-cells. *Exp Cell Res*. 1998;244:302-309.
243. Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;286:433-442.
244. Bukau B, Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. 1998;92:351-366.
245. Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *Embo J*. 1999;18:2040-2048.
246. Xanthoudakis S, Roy S, Rasper D, et al. Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *Embo J*. 1999;18:2049-2056.
247. Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohaszka Z, Nardai G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther*. 1998;79:129-168.
248. Nathan DF, Lindquist S. Mutational analysis of Hsp90 function: interactions with a steroid receptor and a protein kinase. *Mol Cell Biol*. 1995;15:3917-3925.
249. Shakhovich R, Shue G, Kohtz DS. Conformational activation of a basic helix-loop-

- helix protein (MyoD1) by the C-terminal region of murine HSP90 (HSP84). *Mol Cell Biol.* 1992;12:5059-5068.
250. Hartson SD, Matts RL. Association of Hsp90 with cellular Src-family kinases in a cell-free system correlates with altered kinase structure and function. *Biochemistry.* 1994;33:8912-8920.
251. Wartmann M, Davis RJ. The native structure of the activated Raf protein kinase is a membrane-bound multi-subunit complex. *J Biol Chem.* 1994;269:6695-6701.
252. Jaattela M. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med.* 1999;31:261-271.
253. Murakami H, Pain D, Blobel G. 70-kD heat shock-related protein is one of at least two distinct cytosolic factors stimulating protein import into mitochondria. *J Cell Biol.* 1988;107:2051-2057.
254. Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science.* 1990;248:850-854.
255. Shi Y, Thomas JO. The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol Cell Biol.* 1992;12:2186-2192.
256. Nollen EA, Brunsting JF, Roelofsen H, Weber LA, Kampinga HH. In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol Cell Biol.* 1999;19:2069-2079.
257. Carrello A, Allan RK, Morgan SL, et al. Interaction of the Hsp90 cochaperone cyclophilin 40 with Hsc70. *Cell Stress Chaperones.* 2004;9:167-181.
258. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62:670-684.
259. Ehrnsperger M, Graber S, Gaestel M, Buchner J. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *Embo J.* 1997;16:221-229.
260. Shashidharamurthy R, Koteiche HA, Dong J, McHaourab HS. Mechanism of chaperone function in small heat shock proteins: dissociation of the HSP27 oligomer is required for recognition and binding of destabilized T4 lysozyme. *J Biol Chem.* 2005;280:5281-5289.
261. Garrido C. Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers. *Cell Death Differ.* 2002;9:483-485.
262. Theriault JR, Lambert H, Chavez-Zobel AT, Charest G, Lavigne P, Landry J. Essential role of the NH2-terminal WD/EPF motif in the phosphorylation-activated protective function of mammalian Hsp27. *J Biol Chem.* 2004;279:23463-23471.
263. Dorion S, Landry J. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathways by heat shock. *Cell Stress Chaperones.* 2002;7:200-206.
264. Casado P, Zuazua-Villar P, del Valle E, Martinez-Campa C, Lazo PS, Ramos S. Vincristine regulates the phosphorylation of the antiapoptotic protein HSP27 in breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2007;247:273-282.
265. Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;304:505-512.
266. Garrido C, Mehlen P, Fromentin A, et al. Inconstant association between 27-kDa heat-shock protein (Hsp27) content and doxorubicin resistance in human colon cancer cells. The doxorubicin-protecting effect of Hsp27. *Eur J Biochem.* 1996;237:653-659.
267. Garrido C, Ottavi P, Fromentin A, et al. HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. *Cancer Res.* 1997;57:2661-2667.
268. Gurbuxani S, Bruey JM, Fromentin A, et al. Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells. *Oncogene.* 2001;20:7478-7485.
269. Nylandsted J, Wick W, Hirt UA, et al. Eradication of glioblastoma, and breast and colon carcinoma xenografts by Hsp70 depletion. *Cancer Res.* 2002;62:7139-7142.
270. Rocchi P, Beraldi E, Ettinger S, et al. Increased Hsp27 after androgen ablation

- facilitates androgen-independent progression in prostate cancer via signal transducers and activators of transcription 3-mediated suppression of apoptosis. *Cancer Res.* 2005;65:11083-11093.
271. Rocchi P, Jugpal P, So A, et al. Small interference RNA targeting heat-shock protein 27 inhibits the growth of prostatic cell lines and induces apoptosis via caspase-3 activation in vitro. *BJU Int.* 2006;98:1082-1089.
272. Garrido C, Bruey JM, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Solary E. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *Faseb J.* 1999;13:2061-2070.
273. Concannon CG, Orrenius S, Samali A. Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c. *Gene Expr.* 2001;9:195-201.
274. Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, et al. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol.* 2000;2:645-652.
275. Paul C, Manero F, Gonin S, Kretz-Remy C, Viot S, Arrigo AP. Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Mol Cell Biol.* 2002;22:816-834.
276. Chauhan D, Li G, Hideshima T, et al. Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood.* 2003;102:3379-3386.
277. Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie JN, Huot J, Landry J. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci.* 1997;110 (Pt 3):357-368.
278. Rane MJ, Pan Y, Singh S, et al. Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *J Biol Chem.* 2003;278:27828-27835.
279. Charette SJ, Lavoie JN, Lambert H, Landry J. Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol Cell Biol.* 2000;20:7602-7612.
280. Mehlen P, Kretz-Remy C, Preville X, Arrigo AP. Human hsp27, Drosophila hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death. *Embo J.* 1996;15:2695-2706.
281. Arrigo AP, Viot S, Chaufour S, Firdaus W, Kretz-Remy C, Diaz-Latoud C. Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7:414-422.
282. Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, et al. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem.* 1999;274:18947-18956.
283. Wyttenbach A, Sauvageot O, Carmichael J, Diaz-Latoud C, Arrigo AP, Rubinsztein DC. Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin. *Hum Mol Genet.* 2002;11:1137-1151.
284. Liao W, Li X, Mancini M, Chan L. Proteasome inhibition induces differential heat shock protein response but not unfolded protein response in HepG2 cells. *J Cell Biochem.* 2006;99:1085-1095.
285. Gusarova V, Caplan AJ, Brodsky JL, Fisher EA. Apoprotein B degradation is promoted by the molecular chaperones hsp90 and hsp70. *J Biol Chem.* 2001;276:24891-24900.
286. Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsbichler A, et al. p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol.* 2002;160:255-263.
287. Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S, et al. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Mol Cell Biol.* 2003;23:5790-5802.
288. Parcellier A, Brunet M, Schmitt E, et al. HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27Kip1 and helps S-phase re-entry in stressed cells. *Faseb J.* 2006;20:1179-1181.

289. Marin-Vinader L, Shin C, Onnekink C, Manley JL, Lubsen NH. Hsp27 enhances recovery of splicing as well as rephosphorylation of SRp38 after heat shock. *Mol Biol Cell*. 2006;17:886-894.
290. Jaattela M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *Embo J*. 1998;17:6124-6134.
291. Jaattela M. Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *Int J Cancer*. 1995;60:689-693.
292. Jaattela M, Wissing D, Bauer PA, Li GC. Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *Embo J*. 1992;11:3507-3512.
293. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 1997;17:5317-5327.
294. Buzzard KA, Giaccia AJ, Killender M, Anderson RL. Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 1998;273:17147-17153.
295. Park HS, Lee JS, Huh SH, Seo JS, Choi EJ. Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *Embo J*. 2001;20:446-456.
296. Gabai VL, Mabuchi K, Mosser DD, Sherman MY. Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2002;22:3415-3424.
297. Lee JS, Lee JJ, Seo JS. HSP70 deficiency results in activation of c-Jun N-terminal Kinase, extracellular signal-regulated kinase, and caspase-3 in hyperosmolarity-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2005;280:6634-6641.
298. Gao T, Newton AC. The turn motif is a phosphorylation switch that regulates the binding of Hsp70 to protein kinase C. *J Biol Chem*. 2002;277:31585-31592.
299. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem*. 2005;280:38729-38739.
300. Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol*. 2000;2:476-483.
301. Creagh EM, Carmody RJ, Cotter TG. Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and -independent apoptosis in Jurkat T cells. *Exp Cell Res*. 2000;257:58-66.
302. Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol*. 2001;3:839-843.
303. Matsumori Y, Hong SM, Aoyama K, et al. Hsp70 overexpression sequesters AIF and reduces neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005;25:899-910.
304. Ruchalski K, Mao H, Li Z, et al. Distinct hsp70 domains mediate apoptosis-inducing factor release and nuclear accumulation. *J Biol Chem*. 2006;281:7873-7880.
305. Lui JC, Kong SK. Heat shock protein 70 inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor to avoid DNA fragmentation in TF-1 cells during erythropoiesis. *FEBS Lett*. 2007;581:109-117.
306. Sakahira H, Nagata S. Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase. *J Biol Chem*. 2002;277:3364-3370.
307. Connell P, Ballinger CA, Jiang J, et al. The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol*. 2001;3:93-96.
308. Murata S, Minami Y, Minami M, Chiba T, Tanaka K. CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep*. 2001;2:1133-1138.
309. Meacham GC, Patterson C, Zhang W, Younger JM, Cyr DM. The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol*. 2001;3:100-105.
310. McDonough H, Patterson C. CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress Chaperones*. 2003;8:303-308.

311. Luders J, Demand J, Hohfeld J. The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *J Biol Chem.* 2000;275:4613-4617.
312. Alberti S, Esser C, Hohfeld J. BAG-1--a nucleotide exchange factor of Hsc70 with multiple cellular functions. *Cell Stress Chaperones.* 2003;8:225-231.
313. Demand J, Alberti S, Patterson C, Hohfeld J. Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Curr Biol.* 2001;11:1569-1577.
314. Dai Q, Qian SB, Li HH, et al. Regulation of the cytoplasmic quality control protein degradation pathway by BAG2. *J Biol Chem.* 2005;280:38673-38681.
315. Melchior F, Gerace L. Mechanisms of nuclear protein import. *Curr Opin Cell Biol.* 1995;7:310-318.
316. Karin M, Hunter T. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol.* 1995;5:747-757.
317. Imamoto N, Matsuoka Y, Kurihara T, et al. Antibodies against 70-kD heat shock cognate protein inhibit mediated nuclear import of karyophilic proteins. *J Cell Biol.* 1992;119:1047-1061.
318. Okuno Y, Imamoto N, Yoneda Y. 70-kDa heat-shock cognate protein colocalizes with karyophilic proteins into the nucleus during their transport in vitro. *Exp Cell Res.* 1993;206:134-142.
319. Jeoung DI, Chen S, Windsor J, Pollack RE. Human major HSP70 protein complements the localization and functional defects of cytoplasmic mutant SV40 T antigen in Swiss 3T3 mouse fibroblast cells. *Genes Dev.* 1991;5:2235-2244.
320. Shulga N, Roberts P, Gu Z, et al. In vivo nuclear transport kinetics in *Saccharomyces cerevisiae*: a role for heat shock protein 70 during targeting and translocation. *J Cell Biol.* 1996;135:329-339.
321. Zhang X, Chen S, Yoo S, et al. Mutation in nuclear pore component NUP155 leads to atrial fibrillation and early sudden cardiac death. *Cell.* 2008;135:1017-1027.
322. Morimoto R, Fodor E. Cell-specific expression of heat shock proteins in chicken reticulocytes and lymphocytes. *J Cell Biol.* 1984;99:1316-1323.
323. Banerji SS, Theodorakis NG, Morimoto RI. Heat shock-induced translational control of HSP70 and globin synthesis in chicken reticulocytes. *Mol Cell Biol.* 1984;4:2437-2448.
324. Singh MK, Yu J. Accumulation of a heat shock-like protein during differentiation of human erythroid cell line K562. *Nature.* 1984;309:631-633.
325. Davis JQ, Dansereau D, Johnstone RM, Bennett V. Selective externalization of an ATP-binding protein structurally related to the clathrin-uncoating ATPase/heat shock protein in vesicles containing terminal transferrin receptors during reticulocyte maturation. *J Biol Chem.* 1986;261:15368-15371.
326. Banerji SS, Laing K, Morimoto RI. Erythroid lineage-specific expression and inducibility of the major heat shock protein HSP70 during avian embryogenesis. *Genes Dev.* 1987;1:946-953.
327. Winning RS, Browder LW. Changes in heat shock protein synthesis and hsp70 gene transcription during erythropoiesis of *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* 1988;128:111-120.
328. Ray S, Lu Y, Kaufmann SH, et al. Genomic mechanisms of p210BCR-ABL signaling: induction of heat shock protein 70 through the GATA response element confers resistance to paclitaxel-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2004;279:35604-35615.
329. Ribeil JA, Zermati Y, Vandekerckhove J, et al. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature.* 2007;445:102-105.
330. Barati MT, Rane MJ, Klein JB, McLeish KR. A proteomic screen identified stress-induced chaperone proteins as targets of Akt phosphorylation in mesangial cells. *J Proteome Res.* 2006;5:1636-1646.

331. Tsukahara F, Maru Y. Identification of novel nuclear export and nuclear localization-related signals in human heat shock cognate protein 70. *J Biol Chem*. 2004;279:8867-8872.
332. Pirruccello SJ, Young KH, Aoun P. Myeloblast phenotypic changes in myelodysplasia. CD34 and CD117 expression abnormalities are common. *Am J Clin Pathol*. 2006;125:884-894.
333. Chen BG, Zhu M, Luo WD, et al. [The correlation study of PTEN gene expression and Akt phosphorylation in myelodysplastic syndrome]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2007;28:470-473.
334. Lecoq-Lafon C, Verdier F, Fichelson S, et al. Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of GAB1 and its association with SHC, SHP2, SHIP, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Blood*. 1999;93:2578-2585.
335. Miura Y, Miura O, Ihle JN, Aoki N. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by the erythropoietin receptor. *J Biol Chem*. 1994;269:29962-29969.
336. Ingley E, Tilbrook PA, Klinken SP. New insights into the regulation of erythroid cells. *IUBMB Life*. 2004;56:177-184.
337. Tilbrook PA, Palmer GA, Bittorf T, et al. Maturation of erythroid cells and erythroleukemia development are affected by the kinase activity of Lyn. *Cancer Res*. 2001;61:2453-2458.
338. Knowlton AA, Grenier M, Kirchhoff SR, Salfity M. Phosphorylation at tyrosine-524 influences nuclear accumulation of HSP72 with heat stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:H2143-2149.
339. Fresno Vara JA, Caceres MA, Silva A, Martin-Perez J. Src family kinases are required for prolactin induction of cell proliferation. *Mol Biol Cell*. 2001;12:2171-2183.
340. Udell CM, Samayawardhena LA, Kawakami Y, Kawakami T, Craig AW. Fer and Fps/Fes participate in a Lyn-dependent pathway from FcepsilonRI to platelet-endothelial cell adhesion molecule 1 to limit mast cell activation. *J Biol Chem*. 2006;281:20949-20957.
341. Yoo JC, Hayman MJ. HSP70 binds to SHP2 and has effects on the SHP2-related EGFR/GAB1 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;351:979-985.
342. Kharbanda S, Saleem A, Yuan ZM, et al. Nuclear signaling induced by ionizing radiation involves colocalization of the activated p56/p53lyn tyrosine kinase with p34cdc2. *Cancer Res*. 1996;56:3617-3621.
343. Samuels AL, Klinken SP, Ingley E. Liar, a novel Lyn-binding nuclear/cytoplasmic shuttling protein that influences erythropoietin-induced differentiation. *Blood*. 2009;113:3845-3856.
344. Luciano F, Ricci JE, Auberger P. Cleavage of Fyn and Lyn in their N-terminal unique regions during induction of apoptosis: a new mechanism for Src kinase regulation. *Oncogene*. 2001;20:4935-4941.
345. Welch WJ, Mizzen LA. Characterization of the thermotolerant cell. II. Effects on the intracellular distribution of heat-shock protein 70, intermediate filaments, and small nuclear ribonucleoprotein complexes. *J Cell Biol*. 1988;106:1117-1130.
346. Nunes SL, Calderwood SK. Heat shock factor-1 and the heat shock cognate 70 protein associate in high molecular weight complexes in the cytoplasm of NIH-3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;213:1-6.
347. Mandell RB, Feldherr CM. Identification of two HSP70-related *Xenopus* oocyte proteins that are capable of recycling across the nuclear envelope. *J Cell Biol*. 1990;111:1775-1783.
348. O'Malley K, Mauron A, Barchas JD, Kedes L. Constitutively expressed rat mRNA encoding a 70-kilodalton heat-shock-like protein. *Mol Cell Biol*. 1985;5:3476-3483.
349. Dang CV, Lee WM. Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myc, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins. *J Biol Chem*. 1989;264:18019-18023.
350. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to

- constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434:1144-1148.
351. Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, et al. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2004;32:179-187.
352. Subramanian A, Hegde S, Correll PH, Paulson RF. Mutation of the Lyn tyrosine kinase delays the progression of Friend virus induced erythroleukemia without affecting susceptibility. *Leuk Res*. 2006;30:1141-1149.
353. Ghaffari S, Wu H, Gerlach M, Han Y, Lodish HF, Daley GQ. BCR-ABL and v-SRC tyrosine kinase oncoproteins support normal erythroid development in erythropoietin receptor-deficient progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:13186-13190.
354. Whyatt DJ, Karis A, Harkes IC, et al. The level of the tissue-specific factor GATA-1 affects the cell-cycle machinery. *Genes Funct*. 1997;1:11-24.
355. Munugalavadla V, Dore LC, Tan BL, et al. Repression of c-kit and its downstream substrates by GATA-1 inhibits cell proliferation during erythroid maturation. *Mol Cell Biol*. 2005;25:6747-6759.
356. Matthes TW, Meyer G, Samii K, Beris P. Increased apoptosis in acquired sideroblastic anaemia. *Br J Haematol*. 2000;111:843-852.
357. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;89:2079-2088.
358. Ramos F, Fuertes-Nunez M, Suarez-Vilela D, Fernandez-Lopez A. What does apoptosis have to do with clinical features in myelodysplastic syndrome? *Haematologica*. 2002;87:381-391.
359. Invernizzi R. The role of apoptosis in myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 2002;87:337-339.
360. Raza A, Gezer S, Mundle S, et al. Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1995;86:268-276.
361. Gersuk GM, Lee JW, Beckham CA, Anderson J, Deeg HJ. Fas (CD95) receptor and Fas-ligand expression in bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Blood*. 1996;88:1122-1123.
362. Bouscary D, De Vos J, Guesnu M, et al. Fas/Apo-1 (CD95) expression and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 1997;11:839-845.
363. Gersuk GM, Beckham C, Loken MR, et al. A role for tumour necrosis factor-alpha, Fas and Fas-Ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*. 1998;103:176-188.
364. Kitagawa M, Yamaguchi S, Takahashi M, Tanizawa T, Hirokawa K, Kamiyama R. Localization of Fas and Fas ligand in bone marrow cells demonstrating myelodysplasia. *Leukemia*. 1998;12:486-492.
365. Fontenay-Roupie M, Bouscary D, Guesnu M, et al. Ineffective erythropoiesis in myelodysplastic syndromes: correlation with Fas expression but not with lack of erythropoietin receptor signal transduction. *Br J Haematol*. 1999;106:464-473.
366. Claessens YE, Park S, Dubart-Kupperschmitt A, et al. Rescue of early-stage myelodysplastic syndrome-deriving erythroid precursors by the ectopic expression of a dominant-negative form of FADD. *Blood*. 2005;105:4035-4042.
367. Claessens YE, Bouscary D, Dupont JM, et al. In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors from patients with myelodysplastic syndromes: evidence for Fas-dependent apoptosis. *Blood*. 2002;99:1594-1601.
368. Tehranchi R, Fadeel B, Forsblom AM, et al. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits spontaneous cytochrome c release and mitochondria-dependent apoptosis of myelodysplastic syndrome hematopoietic progenitors. *Blood*. 2003;101:1080-1086.
369. Gupta P, Niehans GA, LeRoy SC, et al. Fas ligand expression in the bone marrow in

- myelodysplastic syndromes correlates with FAB subtype and anemia, and predicts survival. *Leukemia*. 1999;13:44-53.
370. Jacobs A. Myelodysplastic syndromes: pathogenesis, functional abnormalities, and clinical implications. *J Clin Pathol*. 1985;38:1201-1217.
371. Sugimoto K, Hirano N, Toyoshima H, et al. Mutations of the p53 gene in myelodysplastic syndrome (MDS) and MDS-derived leukemia. *Blood*. 1993;81:3022-3026.
372. Parker J, Mufti GJ. Ras and myelodysplasia: lessons from the last decade. *Semin Hematol*. 1996;33:206-224.
373. Padua RA, Guinn BA, Al-Sabah AI, et al. RAS, FMS and p53 mutations and poor clinical outcome in myelodysplasias: a 10-year follow-up. *Leukemia*. 1998;12:887-892.
374. Ridge SA, Worwood M, Oscier D, Jacobs A, Padua RA. FMS mutations in myelodysplastic, leukemic, and normal subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:1377-1380.
375. Lorenzo F, Nishii K, Monma F, Kuwagata S, Usui E, Shiku H. Mutational analysis of the KIT gene in myelodysplastic syndrome (MDS) and MDS-derived leukemia. *Leuk Res*. 2006;30:1235-1239.
376. Ebert BL, Pretz J, Bosco J, et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*. 2008;451:335-339.
377. Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2002;30:229-236.
378. Spivak JL. Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management. *Blood*. 2002;100:4272-4290.
379. Prchal JF, Axelrad AA. Letter: Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N Engl J Med*. 1974;290:1382.
380. Weinberg RS. In vitro erythropoiesis in polycythemia vera and other myeloproliferative disorders. *Semin Hematol*. 1997;34:64-69.
381. Means RT, Jr., Krantz SB, Sawyer ST, Gilbert HS. Erythropoietin receptors in polycythemia vera. *J Clin Invest*. 1989;84:1340-1344.
382. Le Couedic JP, Mitjavila MT, Villeval JL, et al. Missense mutation of the erythropoietin receptor is a rare event in human erythroid malignancies. *Blood*. 1996;87:1502-1511.
383. Emanuel PD, Eaves CJ, Broudy VC, et al. Familial and congenital polycythemia in three unrelated families. *Blood*. 1992;79:3019-3030.
384. Hess G, Rose P, Gamm H, Papadileris S, Huber C, Seliger B. Molecular analysis of the erythropoietin receptor system in patients with polycythaemia vera. *Br J Haematol*. 1994;88:794-802.
385. Dai CH, Krantz SB, Dessypris EN, Means RT, Jr., Horn ST, Gilbert HS. Polycythemia vera. II. Hypersensitivity of bone marrow erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocyte progenitor cells to interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1992;80:891-899.
386. Dai CH, Krantz SB, Koury ST, Kollar K. Polycythaemia vera. IV. Specific binding of stem cell factor to normal and polycythaemia vera highly purified erythroid progenitor cells. *Br J Haematol*. 1994;88:497-505.
387. Correa PN, Eskinazi D, Axelrad AA. Circulating erythroid progenitors in polycythemia vera are hypersensitive to insulin-like growth factor-1 in vitro: studies in an improved serum-free medium. *Blood*. 1994;83:99-112.
388. Axelrad AA, Eskinazi D, Correa PN, Amato D. Hypersensitivity of circulating progenitor cells to megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu MGDF) in essential thrombocythemia. *Blood*. 2000;96:3310-3321.
389. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365:1054-1061.

390. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352:1779-1790.
391. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7:387-397.
392. Zhao R, Xing S, Li Z, et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem*. 2005;280:22788-22792.
393. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009;360:2289-2301.
394. Pahl HL. Towards a molecular understanding of polycythemia rubra vera. *Eur J Biochem*. 2000;267:3395-3401.
395. Silva M, Richard C, Benito A, Sanz C, Olalla I, Fernandez-Luna JL. Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med*. 1998;338:564-571.
396. Zeuner A, Pedini F, Signore M, et al. Increased death receptor resistance and FLIPshort expression in polycythemia vera erythroid precursor cells. *Blood*. 2006;107:3495-3502.

Mécanismes de régulation de GATA-1 par les protéines de choc thermique Hsp27 et Hsp70 au cours de la différenciation érythroïde terminale.

Résumé

L'érythropoïèse est le processus permettant la production de globules rouges en grande partie sous le contrôle du facteur de transcription GATA-1 qui active la transcription des gènes érythroïdes et de la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L. Dans ce travail, nous montrons qu'au cours de la différenciation érythroïde, GATA-1 est protégé du clivage de la caspase-3 par la protéine chaperonne Hsp70. D'autre part, la surexpression de GATA-1 induit un blocage de la maturation. Nous avons montré qu'Hsp27 interagit avec GATA-1 et induit sa dégradation par le protéasome.

Nous avons déterminé les mécanismes par lesquels Hsp70 est accumulé dans le noyau des érythroblastes au cours de la différenciation érythroïde terminale. Avant la diminution d'expression de c-Kit, Hsp70 est principalement cytoplasmique car le SCF induit l'export nucléaire d'Hsp70. Au stade de la diminution d'expression de c-Kit, l'export nucléaire induit par le SCF est diminué et l'Epo, en activant Lyn, induit la rétention nucléaire d'Hsp70.

Nous avons confirmé notre modèle au cours de syndromes myélodysplasiques (SMD) de bas grade, où nous avons démontré qu'un défaut de localisation nucléaire d'Hsp70 est en partie responsable du phénotype observé.

Mechanisms of GATA-1 regulation by heat shock proteins Hsp70 and Hsp27 along terminal erythroid differentiation.

Abstract

Erythropoiesis is a process leading to red cells production and is mainly under control of the transcription factor GATA-1 that controls the expression of erythroid genes and the anti-apoptotic protein Bcl-x_L. In this study we demonstrated that during differentiation but not during apoptosis, the chaperone protein Hsp70 protects GATA-1 from caspase 3-mediated proteolysis. On the other hand, GATA-1 overexpression induces a blocage of maturation. Here, we showed that Hsp27 interacts with d GATA-1 to favor proteasomal degradation.

Further, we determined the mechanisms of nuclear accumulation during terminal erythroid differentiation. Before c-Kit down-modulation at basophilic stage, Hsp70 is mainly localized into cytoplasm because SCF induced Hsp70 nuclear export. At the onset of c-Kit down-modulation, SCF induced Hsp70 nuclear export was decreased and Epo activated Lyn induced Hsp70 nuclear accumulation.

We confirmed our model to low grade myelodysplastic syndrome (MDS) were a defect in nuclear localization of Hsp70 is partially responsible for the observed phenotype.

Mots clé : Hsp70, Hsp27, GATA-1, érythropoïèse, SMD.

Key words : Hsp70, Hsp27, GATA-1, erythropoiesis, SMD.