UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : **Cancérologie – Biologie – Médecine – Santé**

Champs disciplinaire : Biochimie, Biologie cellulaire et moléculaire

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 18 mars 2013

par

Carine LEFEVRE

Mécanismes de régulation de la balance prolifération/différenciation érythroïde par les facteurs de transcription GATA-1, FOG-1, E2F et la voie de signalisation Akt

Composition du jury :

Dr Geneviève COURTOIS	Rapporteur
Dr François MORLE	Rapporteur
Dr Anne DUBART KUPPERSCHMITT	Examinateur
Dr Jean-Luc VILLEVAL	Examinateur
Dr Stany CHRETIEN	Directeur de thèse
Dr Zahra KADRI	Co-directeur de thèse

Résumé

Avec plus de 100 milliards de globules rouges produits chaque jour, le lignage érythroïde présente la plus grande capacité de production cellulaire chez le mammifère adulte. Cette production requiert une balance fine entre la prolifération cellulaire, régulée principalement par la voie de signalisation érythropoïétine (Epo)/PI3K/Akt, et la différenciation érythroïde induite par le couple de facteurs de transcription GATA-1/FOG-1. Des interconnexions entre ces deux grands systèmes ont été décrites dans le laboratoire : 1) le facteur de transcription GATA-1 est phosphorylé par Akt en réponse à l'Epo et cette phosphorylation semble avoir un rôle dans la différenciation érythroïde ; 2) GATA-1 est capable d'interagir avec la protéine du rétinoblastome pRb, impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, et le complexe formé est nécessaire à l'érythropoïèse terminale.

L'objectif de ma thèse était d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la balance prolifération/différenciation cellulaire au cours de l'érythropoïèse, et en particulier de déterminer le rôle moléculaire et physiologique de la phosphorylation de GATA-1 par Akt en réponse à l'Epo. Nos travaux ont montré que cette phosphorylation est une des clefs de la dynamique de l'érythropoïèse. Dans sa forme non phosphorylée, GATA-1 ralentit le cycle cellulaire via le complexe GATA-1/pRb/E2F. Cette étape préliminaire est nécessaire à la mise en place de la différenciation érythroïde terminale. La phosphorylation de GATA-1 induit d'une part la dissociation de GATA-1/pRb/E2F favorisant l'expansion cellulaire, et d'autre part la formation du complexe GATA-1/FOG-1 nécessaire à l'activation des gènes érythroïdes. Ce modèle apporte une explication moléculaire au blocage de la différenciation érythroïde terminale induite par le mutant GATA-1^{V205G} qui n'interagit pas avec FOG-1. Ainsi, la phosphorylation constitutive de GATA-1^{V205G} et l'augmentation de la quantité relative de FOG-1 permettent de restaurer la différenciation érythroïde induite par ce mutant *in vitro*. Enfin, l'étude d'un modèle murin exprimant une protéine GATA-1 non phosphorylable par Akt montre l'apparition d'une anémie létale lorsque la voie IGF-1 est inhibée. Cela démontre l'importance de la dynamique moléculaire induite par la phosphorylation de GATA-1, et met en évidence le rôle majeur de l'IGF-1 dans l'érythropoïèse *in vivo*.

En conclusion, nous proposons un nouveau modèle moléculaire de la régulation de la balance prolifération/différenciation érythroïde dans lequel la phosphorylation de GATA-1 par Akt coordonne la distribution de GATA-1 dans deux complexes protéiques fonctionnels différents : GATA-1/pRb/E2F versus GATA-1/FOG-1. Nous mettons également en évidence l'IGF-1 comme acteur central de la compensation mise en place *in vivo* pour pallier à l'absence de phosphorylation de GATA-1.

Mots-clés : Erythropoïèse, GATA-1, Phosphorylation, Akt, FOG-1, IGF-1

Abstract

With more than 100 billion red blood cells generated every day, the erythroid lineage has the largest output of cell production in adult mammals. This production requires a tight balance between cell proliferation, mainly controlled by erythropoietin (Epo)/PI3K/Akt signaling pathway, and erythroid differentiation induced by GATA-1 and FOG-1 transcription factors. Various links between these two processes have been previously demonstrated in the laboratory: 1) Epo-activated Akt directly phosphorylates GATA-1 transcription factors, and this phosphorylation seems to be involved in erythroid differentiation; 2) GATA-1 binds to the cell cycle regulator retinoblastoma protein (pRb), and the resulting complex is essential for terminal erythropoiesis.

We investigated the molecular mechanisms involved in the cell proliferation/differentiation balance during terminal erythropoiesis; in particular, we studied the molecular and physiological role of Epo-induced GATA-1 phosphorylation. Our findings suggest that this phosphorylation is one of the key processes in erythropoiesis dynamics. In its unphosphorylated form, GATA-1 can break cell cycle progression via GATA-1/pRb/E2F complex. This preliminary step is necessary for terminal erythroid differentiation. GATA-1 phosphorylation promotes GATA-1/pRb/E2F dissociation, allowing cell cycle progression, and GATA-1/FOG-1 binding, necessary to activate erythroid genes. Our model provides a molecular explanation for the arrest of terminal erythroid differentiation observed in the non-FOG-1-binding mutant GATA-1^{V205G}. We show that the constitutive phosphorylation of GATA-1^{V205G} and the increase of FOG-1 protein amount rescue erythroid differentiation *in vitro*. Finally, knock-in expression of unphosphorylatable GATA-1 in mice leads to lethal anemia when the IGF-1 signaling pathway is inhibited. This shows the importance of the molecular dynamics of GATA-1 phosphorylation, and highlights the major role of IGF-1 in erythropoiesis, *in vivo*.

In conclusion, we propose a new molecular model for the control of the balance between proliferation and erythroid differentiation. GATA-1 phosphorylation by Akt coordinates the involvement of GATA-1 in two different functional protein complexes: GATA-1/pRb/E2F and GATA-1/FOG-1. We also highlight the major role of IGF-1 in compensating for the lack of GATA-1 phosphorylation *in vivo*.

Key words: Erythropoiesis, GATA-1, Phosphorylation, Akt, FOG-1, IGF-1

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres du jury pour le temps qu'ils ont consacré à ce travail. Je remercie les **Drs Geneviève Courtois** et **François Morlé** pour avoir accepté et pris le temps d'évaluer ce manuscrit, et de me faire part de leurs commentaires. Je remercie également les **Drs Anne Dubart-Kupperschmitt** et **Jean-Luc Villeval** qui ont accepté de faire partie du jury de ma thèse.

Je remercie le **Pr Philippe Leboulch**, directeur de l'iMETI, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de son institut.

Et je remercie le **Dr Stany Chrétien** qui m'a accueillie dans son laboratoire. Merci de m'avoir donné ma chance et permis d'effectuer ma thèse au sein du LEPDS. J'y ai appris énormément, et ça aura été une grande expérience que je n'oublierai pas.

Un immense merci au **Dr Zahra Kadri**, sans qui tout cela n'aurait pas été possible. **Zahra**, quatre ans après, où en est mon QE à ton avis ?? J'aime à penser qu'il a évolué un minimum… ☺. Les séances du mardi midi en 3e année y ont sans doute contribué ;). Je me souviens la première fois que je t'ai vue, tu m'as dit : « Je viens pas ici pour m'emmerder, le jour où je m'éclate pas au labo, je m'en vais ! ». Ok ! ☺. Alors, merci pour ta bonne humeur de chaque instant, tu trouves toujours le mot pour détendre l'atmosphère, évacuer la tension. Tu ne te laisses jamais décourager, et c'est souvent ton entrain et ton enthousiasme qui m'ont remotivée et donné envie de continuer. Merci pour tout ce que tu m'as appris, pour ta présence, et pour le temps et l'énergie incroyables que tu m'as consacrés pendant ces 3 ans et demi, et surtout le « demi » !

Merci aussi à l'ensemble du STI qui m'a accueillie et qui a fait partie de mon quotidien pendant ces 4 années au bâtiment 60. Sans oublier, bien sûr, les lointains collègues du 02 (**Francis** et **Stéphane**, vous m'avez dépannée plus d'une fois avec le Canto ou feu l'ultra-centri du P3 ☺).

Une pensée pour les collègues de l'iMETI, **Pascal** et **Deborah**, tous les zootechniciens qui ont pris soin de nos petites souris (merci spécial à **Seb**), **Antonio** et **Sabrina** pour leur aide précieuse au trieur.

Une pensée également pour mes trois co-thésardes du STI : **Charlotte, Soumeya** et **Jeanne**. C'est toujours rassurant de se dire qu'on n'est pas seul dans cette… aventure ;-), et de pouvoir partager nos expériences… Jeanne, tu m'as emmenée à ma première soirée MAIOT, une autre bonne façon de partager ses expériences de thésards, et le week-end d'accueil fut le début d'une belle aventure… ☺.

Je n'oublie pas, bien entendu, mes anciennes collègues du LEPDS : **Càtia**, je suis très contente de t'avoir rencontrée, et j'espère qu'on continuera à aller prendre des verres ou des chocolats chauds au Starbucks ☺ ; **Cynthia**, on a bien rigolé et déliré pendant tes six mois au STI, c'était bien sympa de maniper avec toi. Même si tu resteras toujours celle qui a réussi à vaincre une plaque de Western…. ☺.

Un merci spécial à **Angé** (mon pti Paddy), ma binôme depuis toutes ces années. On ne se voit plus autant qu'à la fac, mais heureusement, il y a les mails et le téléphone illimité (3h max, après il faut rappeler) ! En cas de pétage de plomb, de petit coup de blues, ou juste d'une envie de rigoler un peu, tu es toujours à l'autre bout du fil pour me rassurer et me dire que tu galères aussi ☺, ou pour me faire partager le dernier PhD comics ! T'inquiètes, on refera partie du même monde très bientôt ☺.

Un énorme merci à mes « coupines du labo ». Les filles, je ne sais pas ce que j'aurais fait sans vous. Ça a toujours été un plaisir de venir au labo, même dans les moments difficiles, et surtout pendant ces longs mois de rédaction, parce que je savais que vous seriez là. Merci pour tous ces moments de détente, ces déjeuners et ces pauses thés dans le bureau du fond, sur la terrasse ou dans le hall, toujours animés de discussions diverses, de fous rires et de délires en tous genres… (vraiment en tous genres !).

Béa, comme tu me l'as dit un jour, tu m'as vue grandir au fil des années… depuis mon M2 jusqu'à maintenant… Merci pour ta présence, ta gentillesse et ta générosité, je ne compte plus le nombre de fois où tu m'as nourrie grâce à la caverne d'Ali-baba qui te sert de bureau ! ☺. Ça y est, tu vas bientôt pouvoir enlever le « futur » de « futur docteur » ;). Ce sera peut-être à moi de t'appeler « futur docteur » bientôt ?

Marine, le début fut un peu chaotique… mais tout ça c'est du passé et aujourd'hui je voudrais te dire……. : « Marine, j'te kiffe !» ;). Merci d'avoir été ma camarade d'open space (on a vu défiler pas mal de monde en 4 ans), toujours prête pour aller manger, pousser un coup de gueule ou m'insulter à chaque nouveau bijou… ☺.

Céline, tu ne devais rester que quelques mois pour remplacer Béa, je suis vraiment contente que tu sois restée ! Je n'oublierai pas ce fameux soir dans le L1 à chanter du Cabrel, ou était-ce du Roch Voisine ? Aucune idée, mais c'était bien marrant ! Merci pour tous ces bons moments, et t'inquiètes, je n'oublie pas que je te dois un gâteau au chocolat ! ;)

Anaïs (Nanaiiiiiisss !!!), deux ans déjà que tu es arrivée au labo… Ça passe vite ! Merci pour toutes ces choses qu'on a pu partager, les concerts, les séries, les catherinettes (merci les filles !) et la Zumbaaa of course ! Tu m'auras bien fait rire avec tes délires, et tu resteras toujours ma copine d'anniv' – 23/6 et 26/3 forever ! – (mais t'auras toujours 3 mois de plus que moi :P !).

Les filles, encore merci pour votre soutien et vos encouragements. Je vous adore, vous allez tellement me manquer… Vous me manquez déjà en fait ! Mais, rassurez-vous, je n'ai pas du tout l'intention de vous laisser tranquilles ! Et, quoi qu'il arrive, je serai toujours partante pour des soirées shopping, des Pizza Pino, ou des soirées DVD (on ne dira pas quels films…… ;)) chez Ana !

Un grand merci tout particulier à toi, **Sacha**. Ces deux dernières années ont été meilleures grâce à toi. Tu m'as soutenue et encouragée pendant ces deux ans, et surtout pendant ces derniers mois que tu as rendus beaucoup plus faciles par ta présence, ton aide, ton soutien et ton réconfort. Tu m'as aidée à ne pas lâcher quand il fallait, et à me vider la tête quand j'en avais besoin. Merci encore pour tout.

Et enfin, merci à **mes parents** et **ma sœur** pour m'avoir supportée ces derniers temps, et m'avoir soutenue (dans tous les sens du terme !) tout au long de ma thèse. Merci de toujours croire en moi.

Liste des Abréviations

ACK : Ammonium-Chloride-Potassium
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNg : ADN génomique
AGM : Aorte – Gonade – Mésonéphros
Aqp1 : Aquaporine
ARN : Acide RiboNucléique
ATP : Adenosine TriPhosphate
BFU-e : Burst-Forming Unit-erythroid
BMP4 : Bone Morphogenetic Protein 4
BSA : Bovine Serum Albumine
CBP : CREB Binding Protein
CCMH : Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
Cdk : Cyclin-dependant kinase
CFC : Colony-Forming Cells
CFU-e : Colony-forming Unit-erythroid
CFU-GEMM : Colony-Forming Unit – Granulocyte/Erythrocyte/Monocyte/ Megakaryocyte
CKII : Caséine Kinase II
CLP : Common Lymphoid Progenitor
CMP : Common Myeloid Progenitor
CREB : Cyclic AMP Response Element-Binding protein
CSH : Cellule Souche Hématopoïétique
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DS-AMKL : Down Syndrome – Acute Megakaryoblastic Leukemia
EDTA : Ethylène Diamine TétraAcétique
EKLF : Erythroid Krüppel-Like Factor
Epo : Erythropoïétine
Epo-R : Récepteur à l'érythropoïétine
FACS : Fluorescence-Activated Cell Sorting
FOG-1 : Friend Of GATA-1
G1HE : GATA-1 Hematopoietic Enhancer
G1HRD : GATA-1 Hematopoietic Regulatory Domain
G3PDH : Glycéraldéhyde-3-Phospho-DésHydrogénase
G6PD : Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase
GFP : Green Fluorescent Protein
GM-CSF : Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPA, B, C : Glycophorine A, B, C
GR : Glucocorticoid Receptor
Hb (A ou F) : Hémoglobine (adulte ou fœtale)
HCT : Hématocrite
HRP : HorseRadish Peroxydase
hTf : holoTransferrine
ICAM-4 : IntraCellular Adhesion Molecule-4
IGF-1 : Insuline-like Growth Factor-1
IGF-1R : récepteur à l'IGF-1
IL- : Interleukine-
IMDM : Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IP : ImmunoPrécipitation
IRES : Internal Ribosome Entry Sequence
JAK2 : Janus Kinase 2
LCR : Locus Control Region
LDH : Lactate Déshydrogénase
Lin : Lineage
LT-CIC : Long-Term Culture-Initiating-Cells
Lu : Lutheran
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MEL : Murine Erythroleukemia cells
MEP : Megakaryocytic/Erythroid Progenitor
MGG : May-Grünwald-Giemsa
MIGR : MSCV-IRES-GFP-Retrovirus
MSCV : Murine Stem Cell Virus
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
Nb : Nombre
PBE : PBS, BSA, EDTA
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
PFK : Phospho-Fructo-Kinase
PI3K : Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase
PIP_2 : Phosphatidyl-Inositol-bisPhosphate
PIP_3 : Phosphatidyl-Inositol-trisPhosphate
PPARγ : Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ
PPP : Picropodophylline
PS : Phosphatidyl-Sérine
RhAG : Rh-associated glycoprotein
RSV : Rous Sarcoma Virus
RT-qPCR : Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction
SCF : Stem Cell Factor
TA : Température Ambiante
TBS-T : Tris Buffer Saline – Tween
TCMH : Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
TfR : Récepteur à la transferrine
TNFα : Tumor Necrosis Factor α
TPO : Thrombopoïétine
UA : Unité Arbitraire
VGM : Volume Globulaire Moyen
WB : Western Blot
α-MEM : α-modified Minimum Essential Medium

Table des matières

Préambule 1

INTRODUCTION 3

I. L'érythropoïèse 5

1. Siège de l'érythropoïèse murine 7

1.1. Ontogénie 7

1.2. L'érythropoïèse chez l'adulte 8

2. Description de l'érythropoïèse au niveau cellulaire 10

3. Le globule rouge : la cellule fonctionnelle 14

3.1. La circulation sanguine – propriétés intrinsèques du globule rouge 14

3.2. Les poumons – fonction du globule rouge 20

3.3. La rate, le foie et la moelle osseuse – destruction des globules rouges ou érythrophagocytose 21

3.4. Pathologies du globule rouge 22

II. Les facteurs moléculaires régulant l'érythropoïèse 27

1. Les cytokines, hormones et la signalisation intracellulaire 28

1.1. L'érythropoïétine et son récepteur 29

1.2. Les voies de signalisation activées par le couple Epo/Epo-R 31

1.3. Coopérations de l'Epo-R avec d'autres récepteurs 36

1.4. IGF-1 et érythropoïèse 39

2. Le facteur de transcription GATA-1 et ses cofacteurs 41

2.1. Le facteur de transcription GATA-1 41

2.2. GATA-1 et ses cofacteurs 53

III. Situation du sujet 67

RESULTATS 73

I. Rôle de la phosphorylation de GATA-1 par Akt : établissement d'un modèle moléculaire dynamique 75

1. Validation des conditions expérimentales pour l'étude de la phosphorylation de GATA-1 par Akt 76

1.1. Validation d'un anticorps spécifique de la Ser310 phosphorylée pour la visualisation directe de la phosphorylation de GATA-1 76

1.2. Détermination des conditions optimales pour l'étude de la phosphorylation Epo-dépendante de GATA-1 82

2. Quel est le rôle de la phosphorylation dans les interactions de GATA-1 avec ses partenaires FOG-1 et pRb ? 85

2.1. Etude du rôle de la phosphorylation de GATA-1 dans l'interaction GATA-1/FOG-1 par co-immunoprécipitation 85

2.2. Etude du rôle de la phosphorylation de GATA-1 dans l'interaction GATA-1/FOG-1 par la technique du double hybride chez la levure 88

2.3. Quel est l'effet de l'augmentation de la quantité de protéines FOG-1 sur l'interaction GATA-1-S310A/FOG-1 ? 92

3. Quel est le rôle de la phosphorylation dans la régulation des fonctions de GATA-1 ? 95

3.1. Quel est l'effet de la phosphorylation sur la régulation de la fonction antiprolifératives du complexe GATA-1/pRb par FOG-1 ? 95
3.2. Quel est l'effet de la phosphorylation sur la régulation de la fonction transactivatrice de GATA-1 par FOG-1 ? 97
II. Application à un modèle de pathologie humaine : restauration *in vitro* du phénotype induit par la protéine GATA-1-V205G 103
1. La protéine GATA-1-V205G est-elle phosphorylée par Akt sur la Ser310 ? 104
2. La phosphorylation constitutive de GATA-1-V205G restaure-t-elle sa capacité à induire une différenciation érythroïde terminale ? 106
2.1. Création de nouveaux vecteurs codant pour les protéines GATA-1-V205G-S310A et GATA-1-V205G-S310D 106
2.2. La protéine GATA-1-V205G-S310D est-elle capable d'induire une différenciation érythroïde terminale ? 107
3. L'augmentation de la quantité de FOG-1 restaure-t-elle la différenciation érythroïde induite par GATA-1-V205G-S310D ? 110
3.1. Etablissement de nouvelles lignées G1E et G1E-ER surexprimant la protéine FOG-1 110
3.2. Validation physiologique des nouvelles lignées G1E-ER-Fog-1 par induction à l'œstradiol 111
3.3. La protéine GATA-1-V205G-S310D restaure-t-elle une différenciation érythroïde totale dans les cellules surexprimant FOG-1 ? 114
III. Application à un modèle physiologique : étude d'un modèle de souris Knock-In exprimant une protéine GATA-1 non phosphorylable par Akt – GATA-1-S310A 117
1. L'érythropoïèse fœtale des souris gata-1-S310A est-elle équivalente à celle des souris contrôle ? 119
2. L'érythropoïèse adulte des souris gata-1-S310A est-elle équivalente à celle des souris contrôle ? 128
2.1. Les globules rouges gata-1-S310A sont-ils équivalents aux contrôles ? 128
2.2. La production érythrocytaire des souris gata-1-S310A adultes est-elle équivalente à celle des contrôles ? 131
2.3. Quel est le rôle de l'insuline/IGF-1 et de la transferrine dans l'érythropoïèse des souris gata-1-S310A ? 135
3. Quel est le rôle de la voie IGF-1 dans l'érythropoïèse des souris gata-1-S310A ? 138
3.1. Approche expérimentale 138
3.2. L'inhibition de la voie IGF-1 induit une anémie chez les souris gata-1-S310A 139
3.3. La morphologie des globules rouges des souris gata-1-S310A semble être modifiée après inhibition de la voie IGF-1 : 141
3.4. La teneur en hémoglobine des globules rouges des souris gata-1-S310A semble être modifiée après inhibition de la voie IGF-1 : 143
3.5. L'anémie des souris gata-1-S310A/PPP est-elle régénérative ou arégénérative ? 145
4. Compléments de l'étude de l'érythropoïèse des souris gata-1-S310A : résultats préliminaires 159
4.1. Pourquoi les globules rouges des souris gata-1-S310A ont-ils une durée de vie inférieure à celle des souris contrôle ? 160
4.2. Pistes d'explications moléculaires de la compensation de l'absence de phosphorylation de GATA-1 chez les souris gata-1-S310A 162
4.3. Les souris gata-1-S310A adultes ne présentent pas de défauts majeurs de l'érythropoïèse en condition homéostatique à 12 semaines. Qu'en est-il pour des animaux plus âgés ? 166

4.4. Si les souris gata-1-S310A présentent un défaut de l'érythropoïèse, quel est le potentiel de reconstitution hématopoïétique des cellules souches de ces souris ? 167

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 175

1. Comment la phosphorylation de GATA-1 par Akt régule-t-elle la balance entre prolifération et différenciation érythroïde ? 177

1.1. Comment la phosphorylation de GATA-1 par Akt augmente-t-elle l'affinité GATA-1/FOG-1 ? 178

1.2. La phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 permet la transcription d'une certaine catégorie de gènes 184

1.3. La phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 est nécessaire pour les dernières étapes de la différenciation érythroïde 188

2. L'IGF-1 compense les défauts érythroïdes dus à l'absence de phosphorylation de GATA-1 191

2.1. Mécanismes de compensation chez la souris 193

2.2. Un défaut érythroïde compensé par l'IGF-1 195

2.3. Mécanismes moléculaires et cellulaires proposés 196

MATERIEL ET METHODES 203

1. Culture cellulaire 205

2. Cytométrie 208

3. Expression de protéines exogènes 209

4. Biochimie 211

5. Biologie moléculaire 214

6. Lignées murines 217

BIBLIOGRAPHIE 225

Table des Illustrations

Illustration 1 : Compartimentation et organisation hiérarchique de l'hématopoïèse adulte 5
Illustration 2 : Synopsis du développement érythropoïétique chez la souris (d'après Medvinsky et al., 2011) 7
Illustration 3 : Les cellules de l'érythropoïèse et leurs caractéristiques..... 10
Illustration 4 : Schéma d'un îlot érythroblastique comprenant un macrophage central entouré d'érythroblastes à différents stades de différenciation (d'après Chasis and Mohandas, 2008). 12
Illustration 5 : Mise en évidence des différents stades de l'érythropoïèse selon les marqueurs de surface Ter119 et CD71 chez la souris (Zhang et al., 2003) 13
Illustration 6 : Le globule rouge 14
Illustration 7 : Modèle schématique de l'organisation de la membrane érythrocytaire (Liu et al., 2011)..... 17
Illustration 8 : Le métabolisme du glucose 20
Illustration 9 : La molécule d'hémoglobine 20
Illustration 10 : Classification des anémies..... 24
Illustration 11 : Une morphologie anormale des globules rouges : l'échinocytose (Weber et al., 2008) 25
Illustration 12 : Les facteurs moléculaires régulant l'érythropoïèse (adapté de Vicente et al., 2012)..... 27
Illustration 13 : Epo et SCF : les deux cytokines majeures de l'érythropoïèse (d'après Courtois et al., 2007)..... 29
Illustration 14 : Principales voies de signalisation activées par le couple Epo/Epo-R 31
Illustration 15 : Schéma simplifié du cycle cellulaire (d'après Meijer, 2003) 34
Illustration 16 : Mécanismes de coopération entre c-Kit et Epo-R (adapté de Arcasoy and Jiang, 2005)..... 37
Illustration 17 : Epissage alternatif du gène gata-1 humain (Sankaran et al., 2012)..... 42
Illustration 18 : Structure de GATA-1 43
Illustration 19 : Impact de GATA-1 et ses partenaires sur les différents lignages hématopoïétiques (Ferreira et al., 2005) 44
Illustration 20 : Sites de modifications post-traductionnelles de GATA-1 (Ferreira et al., 2005)..... 49
Illustration 21 : Partenaires de GATA-1 54
Illustration 22 : Mutations de GATA-1 associées à des pathologies humaines (Weiss et al., 2012) 55
Illustration 23 : Structure schématique de la protéine FOG-1 murine (Cantor and Orkin, 2005) 56
Illustration 24 : Des mutations de GATA-1 abrogeant l'interaction GATA-1/FOG-1 sont associées à des pathologies humaines (Crispino, 2005; Ferreira et al., 2005) 58
Illustration 25 : Différents mécanismes de régulation transcriptionnelle par GATA-1 (Kim and Bresnick, 2007) 61
Illustration 26 : Quel est le rôle de la phosphorylation de GATA-1 dans la différenciation érythroïde ? 69
Illustration 27 : Quels mécanismes régulent l'équilibre moléculaire entre GATA-1/pRb et GATA-1/FOG-1 ?..... 70
Illustration 28 : La phosphorylation de GATA-1 par Akt régule la balance entre prolifération et différenciation érythroïde 178
Illustration 29 : Structure de l'interaction GATA-1/FOG-1 (Liew et al., 2005)..... 180
Illustration 30 : Représentation tridimensionnelle du doigt de zinc C-terminal de la protéine GATA-1 de poulet lié à la double hélice d'ADN 180
Illustration 31 : Hypothèse d'interaction conjointe ADN/GATA-1/FOG-1..... 181
Illustration 32 : Représentation schématique de la régulation différentielle de la transcription par le complexe GATA-1/FOG-1 en fonction de la phosphorylation 185
Illustration 33 : Activation de différentes combinaisons de gènes par GATA-1/FOG-1 et E2F en fonction du niveau de phosphorylation de GATA-1 186
Illustration 34 : Impact de la phosphorylation de GATA-1 sur la différenciation érythroïde terminale..... 189
Illustration 35 : L'érythropoïèse des souris gata-1-S310A est différente de celle des souris sauvages 192
Illustration 36 : Hypothèses de mécanismes d'action de l'IGF-1 pour compenser l'absence de phosphorylation de GATA-1 197
Illustration 37 : Modèle hypothétique de compensation de l'absence de phosphorylation de GATA-1 par l'IGF-1 via le facteur de transcription érythroïde EKLF..... 200

Préambule

Le processus de différenciation cellulaire définit toutes les modifications morphologiques et moléculaires que subit une cellule immature pour devenir une cellule spécialisée. Un petit nombre de cellules souches permet de générer une grande quantité de cellules spécialisées. Ce phénomène nécessite une forte expansion et est donc étroitement couplé à la prolifération cellulaire. En effet, chaque lignage possède ses caractéristiques spécifiques, mais tout processus de maturation implique une balance fine et régulée entre prolifération et différenciation cellulaire. De manière simplifiée, la prolifération cellulaire est un processus commun à tous les types cellulaires et est contrôlée par les voies de signalisation et des protéines ubiquitaires, tandis que la différenciation est régulée par des facteurs de transcription spécifiques de chaque lignage. Cependant, l'équilibre entre ces deux processus n'est pas encore connu. La recherche des interconnexions entre les voies de signalisation ou les protéines ubiquitaires et les facteurs de transcription peut permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires contrôlant la balance entre prolifération et différenciation cellulaire.

Le système érythropoïétique constitue un modèle relativement simple et accessible pour l'étude de ces mécanismes. Ainsi, le laboratoire a montré d'une part que le facteur de transcription érythroïde GATA-1 interagit avec la protéine ubiquitaire pRb, régulateur du cycle cellulaire, pour inhiber la prolifération des progéniteurs érythroïdes ; d'autre part que GATA-1 est phosphorylé par Akt en réponse à la signalisation de l'érythropoïétine (Epo) et que cette phosphorylation semble avoir un effet sur la différenciation érythroïde.

Dans cette perspective, l'objectif de mon travail de thèse était de définir le rôle moléculaire et physiologique de la phosphorylation de GATA-1 par Akt. Dans un premier temps, j'ai étudié le rôle moléculaire de cette phosphorylation dans des modèles *in vitro*, ce qui a permis de proposer un modèle d'équilibre moléculaire. J'ai ensuite appliqué cet équilibre moléculaire à un modèle de pathologie humaine pour tenter de restaurer la différenciation érythroïde *in vitro*. Enfin, j'ai appliqué cet équilibre moléculaire à un modèle physiologique en étudiant l'érythropoïèse de souris exprimant une protéine GATA-1 non phosphorylable.

Afin de présenter et discuter au mieux mes résultats, je commencerai ce manuscrit par une introduction bibliographique qui se déroulera en trois parties. La première partie présentera l'érythropoïèse ainsi que les caractéristiques fonctionnelles du globule rouge. Dans la deuxième partie, je décrirai la régulation de l'érythropoïèse par les cytokines et les facteurs de transcription en me focalisant sur l'Epo et GATA-1. Enfin, la troisième partie sera consacrée à poser les questions qui seront abordées au cours de mon travail et à les replacer précisément dans leur contexte bibliographique.

INTRODUCTION

I. L'érythropoïèse

L'hématopoïèse définit l'ensemble des mécanismes assurant la production continue et régulée de toutes les cellules sanguines (**Illustration 1**). Située dans la moelle osseuse chez le mammifère adulte, c'est un processus de maturation extrêmement régulé où les cellules différenciées de chacune des lignées sanguines (érythroïde, mégacaryocytaire, granulomacrophagique et lymphocytaire) sont renouvelées en permanence à partir d'un même pool de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Sous l'influence de facteurs stimulants, la CSH perd sa capacité d'auto-renouvellement et se différencie en deux types de progéniteurs multipotents : le CLP et le CMP, s'orientant ainsi respectivement vers le lignage lymphoïde ou le lignage myéloïde. Au fur et à mesure des divisions, ces progéniteurs vont devenir unipotents, c'est-à-dire qu'ils seront capables de générer un seul lignage. La différenciation en précurseurs les rendra identifiables morphologiquement. L'étape finale de différenciation donnera des cellules matures qui pourront alors exercer leurs fonctions en passant dans la circulation sanguine.

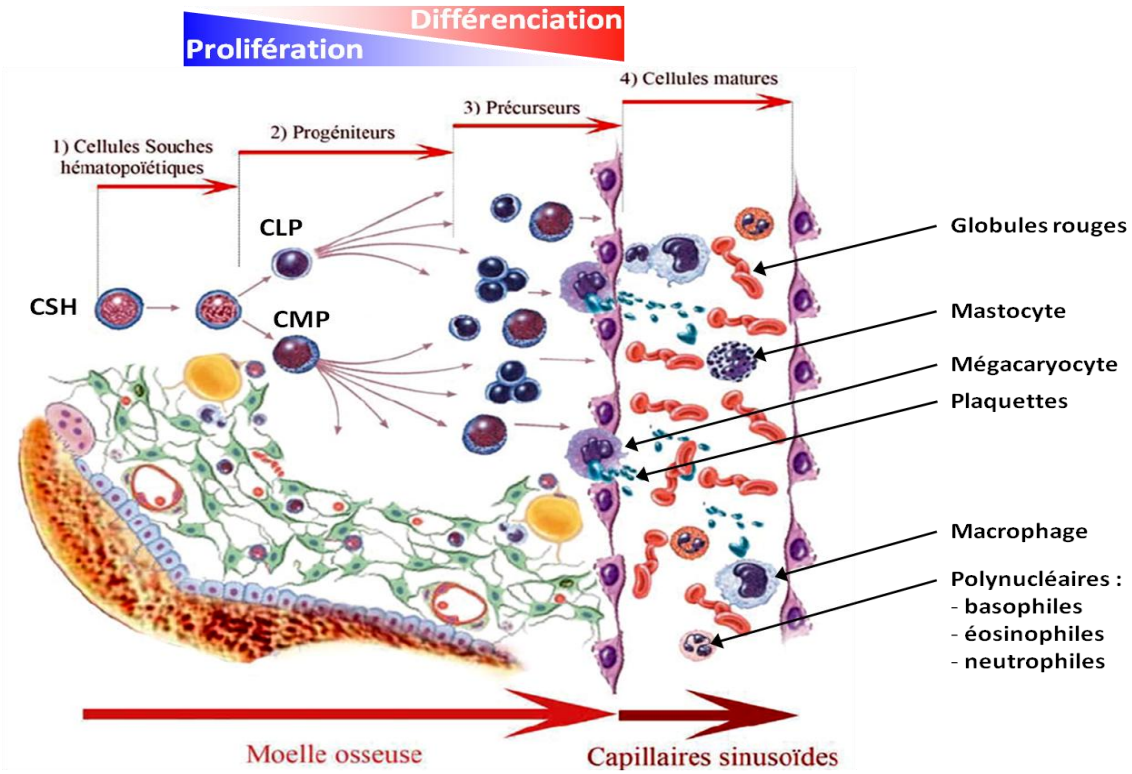


Illustration 1 : **Compartimentation et organisation hiérarchique de l'hématopoïèse adulte**
L'hématopoïèse est le processus de maturation permettant le renouvellement permanent de toutes les cellules sanguines à partir d'un pool de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Elle a lieu dans la moelle osseuse et peut se diviser en quatre compartiments notés ici de 1) à 4). La CSH se différencie en deux types de progéniteurs multipotents : un progéniteur lymphoïde (CLP) et un progéniteur myéloïde (CMP). Ces deux progéniteurs vont perdre progressivement leur multipotence pour devenir des cellules matures. Les différents types de cellules matures issues de la lignée myéloïde sont indiqués. **CSH** : Cellule Souche Hématopoïétique ; **CLP** : Common Lymphoid Progenitor ; **CMP** : Common Myeloid Progenitor.

Parmi les différents lignages hématopoïétiques, l'**érythropoïèse** permet la formation des globules rouges ou **érythrocytes**. Leur fonction principale est d'assurer le transport de l'oxygène des poumons vers les autres tissus de l'organisme. Ils nécessitent un renouvellement permanent et une régulation fine et précise de leur production afin de maintenir l'homéostasie du système. La production de globules rouges représente le plus haut rendement du système hématopoïétique, avec un taux de production estimé à 200 milliards d'érythrocytes par jour. Pour assurer une telle production, les progéniteurs et précurseurs érythroïdes en cours de maturation possèdent encore un grand potentiel prolifératif. Cependant, ce potentiel diminue progressivement au cours de l'érythropoïèse. L'équilibre entre prolifération cellulaire et différenciation érythroïde est en effet finement régulé au cours de l'érythropoïèse.

L'érythropoïèse est le processus de différenciation le plus simple à étudier. En effet, son efficacité est facilement observable puisqu'un défaut de ce processus conduit rapidement à une anémie. De plus, l'analyse de l'érythropoïèse ne nécessite pas de procédure invasive : les cellules matures sont facilement accessibles par un simple prélèvement sanguin. D'autre part, le système érythropoïétique est l'un des premiers systèmes mis en place au cours du développement, un impact important sur l'érythropoïèse entraîne alors une létalité embryonnaire chez la souris. Les modèles murins nous permettent d'ailleurs d'observer des phénotypes gène-spécifiques sous différentes conditions : les précurseurs érythroïdes du foie fœtal décrivent l'érythropoïèse embryonnaire et les précurseurs de la moelle et de la rate (médullaires et spléniques) illustrent l'érythropoïèse adulte.

Afin de situer au mieux les résultats qui seront présentés plus loin, ce premier chapitre présentera dans un premier temps l'ontogénie de l'érythropoïèse murine. Il décrira ensuite les différentes étapes de l'érythropoïèse au niveau cellulaire. La troisième partie sera finalement consacrée à la description des propriétés et de la fonction de la cellule mature : le globule rouge.

1. Siège de l'érythropoïèse murine

1.1. Ontogénie

Comme chez l'homme, le siège de l'érythropoïèse murine se déplace au cours du développement. Elle commence dans le sac vitellin puis se poursuit dans la région AGM (aorte – gonade – mésonéphros) qui entoure l'aorte dorsale de l'embryon, et le placenta. À partir du 10e jour de développement embryonnaire, le foie fœtal devient le siège principal de l'érythropoïèse. Enfin, à la naissance, l'érythropoïèse s'établit définitivement dans la moelle osseuse (pour revue : Orkin and Zon, 2008) (**Illustration 2**).

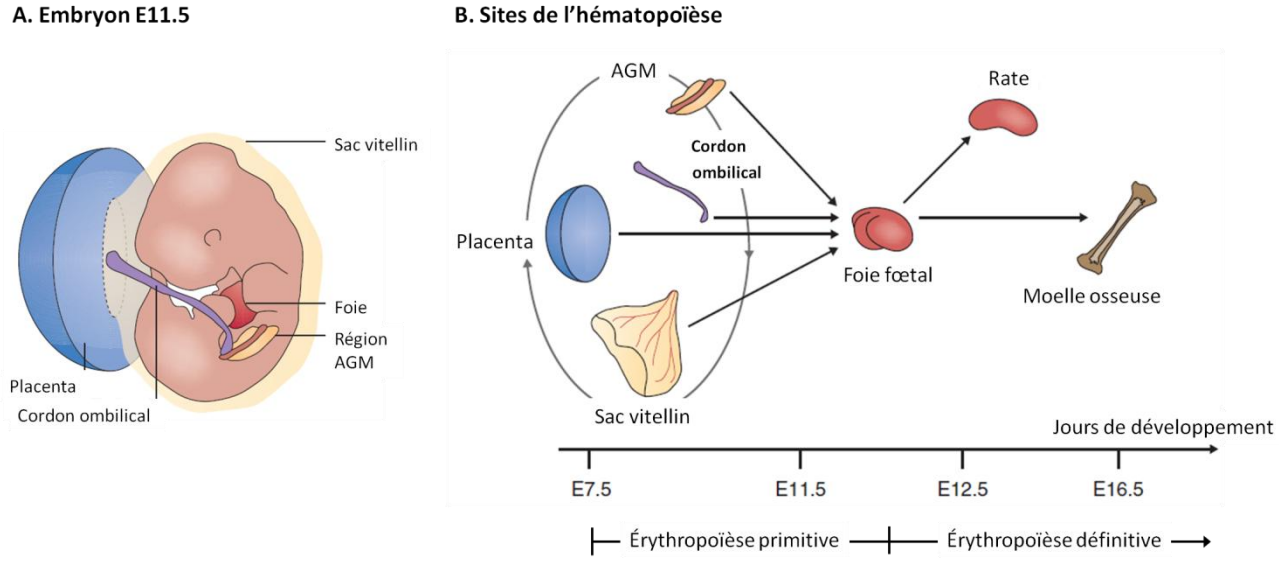


Illustration 2 : Synopsis du développement érythropoïétique chez la souris (d'après Medvinsky et al., 2011)
A. Schéma d'un embryon de souris à 11,5 jours de développement (E11.5) montrant la localisation des différents tissus érythropoïétiques. Région **AGM** : aorte – gonades – mésonéphros. **B.** Succession des différents sites de l'érythropoïèse au cours du développement embryonnaire murin. L'érythropoïèse primitive commence à 7,5 jours de développement dans les îlots sanguins du sac vitellin. Elle est remplacée par l'érythropoïèse définitive qui commence dans le foie et se poursuit dans la rate et la moelle osseuse.

Chez la souris, la production des globules rouges peut se diviser en deux phases distinctes : l'érythropoïèse primitive et l'érythropoïèse définitive (McGrath and Palis, 2008).

L'érythropoïèse primitive remplit les fonctions érythroïdes critiques pour la survie et la croissance de l'embryon dans les premiers stades de développement. Elle commence à 7.5 jours de développement, dans les îlots sanguins du sac vitellin, par la production de gros érythroblastes immatures qui commencent à circuler à 8.5 jours de développement. Ces érythroblastes primitifs maturent progressivement dans la circulation sanguine pour devenir, après énucléation entre E12.5 et E17.5, des érythrocytes primitifs. Ces érythrocytes primitifs expriment les sept gènes de globines murins : ζ, α1, α2, εγ, βH1, βmajeur et βmineur (Trimborn et al., 1999). L'érythropoïèse primitive est

progressivement remplacée au cours du développement par l'érythropoïèse définitive. Les deux types de cellules matures circulent simultanément dans l'embryon jusqu'aux stades tardifs du développement.

L'érythropoïèse définitive commence dans le foie fœtal. Peu après la formation du foie (E9.5), il est colonisé par des précurseurs hématopoïétiques. Les premiers érythrocytes définitifs énucléés émergent du foie fœtal à 12.5 jours de développement. Durant les jours qui suivent, le nombre de cellules érythroïdes définitives augmente de manière exponentielle dans la circulation avec la croissance rapide et continue du fœtus. À partir du 15e jour de développement embryonnaire, l'érythropoïèse est progressivement déplacée dans la moelle osseuse. Le foie cesse d'être un organe érythropoïétique peu après la naissance. Les érythrocytes fœtaux sont environ deux fois plus gros et contiennent deux fois plus d'hémoglobine que leurs homologues adultes. Les érythrocytes définitifs n'expriment plus que les quatre gènes de globines suivants : α1, α2, βmajeur et βmineur (Trimborn et al., 1999).

1.2. L'érythropoïèse chez l'adulte

Les globules rouges murins ont une durée de vie de 40 jours. Ils nécessitent un renouvellement permanent. Chez la souris adulte, ce renouvellement quotidien est assuré par l'érythropoïèse médullaire. Toutefois, à la différence de l'homme, la rate est également un organe érythropoïétique important. Dans les conditions physiologiques normales, la répartition des progéniteurs érythroïdes est de 90% dans la moelle osseuse et 10% dans la rate (Richmond et al., 2005). En cas d'hypoxie aiguë ou d'anémie sévère, l'érythropoïèse de stress se met en place dans la rate, qui devient alors un organe érythropoïétique majeur et peut augmenter jusqu'à 10 fois de volume pour répondre aux besoins.

La description des progéniteurs érythroïdes et des mécanismes moléculaires régulant l'érythropoïèse sera effectuée dans les chapitres suivants de cette introduction. Cependant, l'érythropoïèse de stress implique des progéniteurs et des mécanismes de régulation spécifiques, différents de ceux de l'érythropoïèse médullaire. J'ai donc choisi d'inclure dans ce chapitre un paragraphe décrivant ce processus particulier.

L'érythropoïèse de stress

L'hypoxie tissulaire induite par une anémie aiguë ou au cours du développement conduit à l'activation d'une réponse physiologique destinée à augmenter la distribution d'oxygène aux tissus. Cette réponse impliquant le développement rapide de nouveaux érythrocytes est nommée « **érythropoïèse de stress** ». Chez la souris adulte, l'érythropoïèse de stress a lieu dans la rate et le

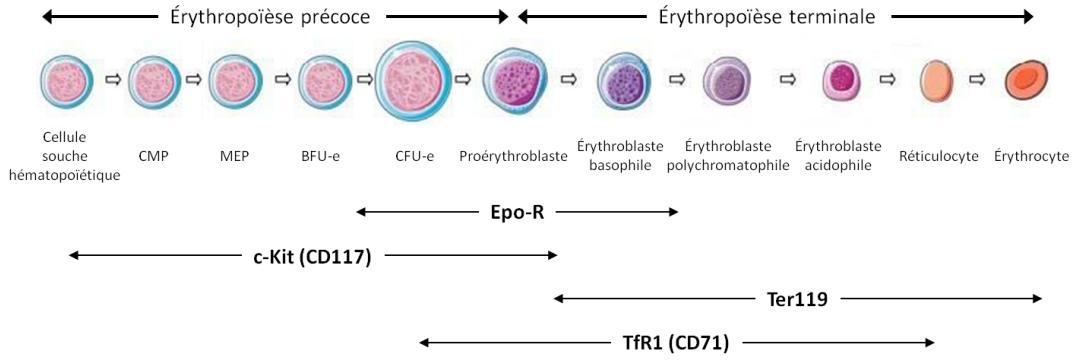
foie (Lenox et al., 2005, 2009). Elle implique une population de progéniteurs érythroïdes spécifiques différents des progéniteurs médullaires (Lenox et al., 2005). Ces progéniteurs érythroïdes de stress sont présents dans la rate à l'état quiescent. En réponse à un stress érythroïde aigu, ils sont capables de proliférer et de se différencier en érythroblastes en seulement 7 jours (14 jours pour les progéniteurs médullaires).

L'érythropoïétine (Epo) joue un rôle important dans l'érythropoïèse de stress. Une hypoxie sévère entraîne une augmentation du taux d'Epo jusqu'à 1000 fois (Ebert and Bunn, 1999), permettant l'augmentation de la production érythrocytaire. La régulation de l'érythropoïèse de stress implique également d'autres facteurs comme le SCF (Stem Cell Factor) (Broudy et al., 1996) et les glucocorticoïdes (Bauer et al., 1999). Ces facteurs agissent en synergie avec l'Epo (voir § II.1.3.). Plus récemment, l'équipe de R. Paulson a mis en évidence la production de BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4) dans la rate en réponse à une anémie aiguë (Lenox et al., 2005). Le BMP4 agit en synergie avec le SCF et l'hypoxie pour induire l'expansion et la différenciation des progéniteurs de stress (Perry et al., 2007) qui deviennent alors sensibles à l'Epo et se différencient rapidement en érythroblastes. Ce phénomène conduit à la mobilisation quasi-complète des progéniteurs de stress de la rate. Des progéniteurs médullaires migrent alors vers la rate, et sous l'influence du signal Hedgehog dans le microenvironnement splénique, ils se développent en progéniteurs de stress sensibles au BMP4 (Perry et al., 2009). La population de progéniteurs produite par l'érythropoïèse de stress présente des marqueurs de surface à la fois immatures et matures. En effet, l'expansion *in vitro* de progéniteurs de stress spléniques par la synergie du BMP4, du SCF et de l'hypoxie conduit à une population de phénotype c-Kit+CD71+Ter119+ (Perry et al., 2007). De plus, Bauer et coll. ont identifié chez la souris l'augmentation d'une population de progéniteurs CD34+c-Kit+Ter119+ dans la rate après induction d'un stress érythroïde par la phénylhydrazine (Bauer et al., 1999).

Une étude récente montre que l'érythropoïèse de stress peut aussi intervenir dans la correction d'une anémie chronique (Millot et al., 2010). En effet, un traitement par l'Epo entraîne une forte stimulation de la synthèse de BMP4 par les macrophages de la rate, une augmentation des progéniteurs de stress et une forte réponse érythropoïétique non retrouvée dans la moelle. L'érythropoïèse de stress a également lieu dans le foie fœtal au cours du développement embryonnaire (Porayette and Paulson, 2008). En effet, cette étude montre que le foie fœtal murin contient deux populations de progéniteurs érythroïdes : une population similaire aux progéniteurs médullaires de l'érythropoïèse physiologique, et une autre population présentant des caractéristiques des progéniteurs de stress spléniques. (pour revue : Paulson et al., 2011).

2. Description de l'érythropoïèse au niveau cellulaire

L'érythropoïèse peut être schématiquement divisée en deux étapes selon le mode d'indentification des progéniteurs : l'érythropoïèse précoce et l'érythropoïèse terminale. Les progéniteurs précoces sont morphologiquement identiques, on les identifie alors grâce au type de colonies qu'ils génèrent dans des systèmes de culture *in vitro*. Par contre, les progéniteurs des stades terminaux sont identifiables par leur morphologie qui se modifie au cours de la différenciation. Une coloration au May-Grünwald-Giemsa (MGG) permet alors de les différencier. Les différents stades de l'érythropoïèse (précoces ou terminaux) peuvent également être mis en évidence en cytométrie de flux par certains marqueurs de surface spécifiques ou non de la lignée érythroïde et dont l'expression varie au cours de la maturation (**Illustration 3**).



Reconstitution médullaire	+	-		
Caractérisation fonctionnelle (culture *in vitro*)	LT-CIC	CFC		-
		10-14 jrs	2-3 jrs	
Caractérisation phénotypique	Lin, CD34, CD33, c-Kit			c-Kit, Ter119, CD71
Caractérisation morphologique	-			Coloration MGG

Illustration 3 : <u>Les cellules de l'érythropoïèse et leurs caractéristiques</u>
L'érythropoïèse se divise schématiquement en deux étapes : l'érythropoïèse précoce et l'érythropoïèse terminale. Les différents stades de la différenciation érythroïde sont représentés. Les périodes d'expression de l'Epo-R (récepteur à l'érythropoïétine) et des marqueurs de surface que nous utiliserons sont indiqués. Les niveaux d'expression de ces protéines peuvent varier en fonction des stades. Les méthodes de caractérisation des différents stades de différenciation sont indiqués dans le tableau : les progéniteurs précoces sont identifiables fonctionnellement par culture *in vitro*, les progéniteurs terminaux sont identifiables morphologiquement par coloration MGG. Des marqueurs de surface permettent également de caractériser les différents progéniteurs. **CMP** : Common Myeloid Progenitor ; **MEP** : Megakaryocytic/Erythroid Progenitor ; **BFU-e** : Burst-Forming Unit-erythroid ; **CFU-e** : Colony-Forming Unit-erythroid ; **Epo-R** : récepteur de l'érythropoïétine ; **CD** : Cluster of Differentiation ; **c-Kit** : récepteur du Stem Cell Factor; **TfR1** : récepteur de la transferrine 1 ; **LT-CIC** : Long-Term Culture-Initiating-Cells ; **CFC** : Colony-Forming Cells ; **MGG** : May-Grünwald-Giemsa.

Au cours de l'**érythropoïèse précoce**, la cellule souche hématopoïétique restreint progressivement sa multipotence pour s'engager dans la voie érythroïde. Elle commence par s'engager dans la voie myéloïde pour devenir un progéniteur myéloïde commun ou CMP (Common Myeloid Progenitor), appelé aussi CFU-GEMM (Colony-Forming Unit – Granulocyte/Erythrocyte/Monocyte/Megakaryocyte). Ce progéniteur donne ensuite naissance au MEP (Megakaryocytic/Erythroid Progenitor), un progéniteur commun des voies érythroïde et mégacaryocytaire. Ce dernier s'engage alors définitivement vers la lignée érythroïde et devient BFU-e (Burst-Forming Unit – erythroid), puis CFU-e (Colony-Forming Unit – erythroid). Les BFU-e et CFU-e sont deux populations de progéniteurs distincts définies fonctionnellement par des études de clonogénicité : ces progéniteurs sont identifiés grâce au type de colonies qu'ils génèrent après culture *in vitro* en milieu semi-solide.

Le BFU-e est le premier progéniteur irréversiblement engagé dans la voie érythroïde. Il se divise lentement et est dépendant du SCF (Stem Cell Factor) et d'autres facteurs de croissance hématopoïétiques comme l'interleukine-3 (IL-3) ou le GM-CSF (Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor) pour sa croissance et sa prolifération. *In vitro*, en milieu semi-solide, il donne de grosses colonies (bursts) contenant plus de 500 érythroblastes en 15 jours chez l'homme, et en 7-10 jours chez la souris (Gregory and Eaves, 1977, 1978). Les BFU-e expriment peu de récepteurs à l'Epo à leur surface.

Le descendant direct du BFU-e est le CFU-e. Contrairement aux BFU-e, les CFU-e se divisent rapidement et répondent fortement à l'Epo qui agit sur eux comme un facteur de survie indispensable. *In vitro*, les CFU-e forment des petites colonies de 8 à 100 érythroblastes en 7 jours chez l'homme, et en 2 jours chez la souris (Gregory and Eaves, 1977, 1978).

Les CFU-e donnent alors naissance aux proérythroblastes qui vont maturer progressivement en érythrocytes au cours de l'érythropoïèse terminale.

L'**érythropoïèse terminale** correspond en effet à l'ensemble des modifications morphologiques et fonctionnelles aboutissant à partir d'un proérythroblaste à la formation d'un globule rouge mature. C'est un processus finement régulé impliquant une rapide prolifération avant la sortie du cycle cellulaire. Toute la différenciation érythroïde terminale a lieu dans les îlots érythroblastiques, les niches spécialisées au sein de la cavité osseuse dans lesquelles les érythroblastes prolifèrent et se différencient autour d'un macrophage central (Chasis and Mohandas, 2008) (**Illustration 4**).

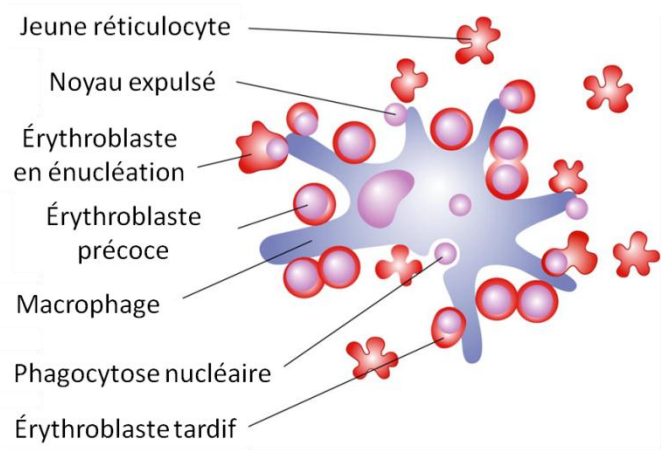


Illustration 4 : <u>Schéma d'un îlot érythroblastique comprenant un macrophage central entouré d'érythroblastes à différents stades de différenciation</u> (d'après Chasis and Mohandas, 2008).
Les érythroblastes les plus précoces sont de larges cellules avec un noyau centré. Les érythroblastes les plus différenciés sont plus petits et leur noyau est adjacent à la membrane plasmique. Les noyaux expulsés sont phagocytés par le macrophage central et les jeunes réticulocytes multilobés se séparent du macrophage.

Les proérythroblastes sont les premières cellules érythroïdes identifiables morphologiquement dans la moelle osseuse. Ils se différencient pour générer successivement des érythroblastes basophiles, polychromatophiles et acidophiles. Ces érythroblastes tirent leurs noms de la couleur qu'adopte leur cytoplasme après coloration en MGG. Celui-ci réagit aux différents colorants en fonction de sa composition acido-basique. Initialement basophile, il devient acidophile grâce à l'augmentation progressive de la quantité d'hémoglobine cellulaire. Parallèlement, la chromatine se condense, les organites tels que le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi sont peu à peu éliminés et la taille cellulaire diminue.

Ces changements morphologiques sont accompagnés d'une modification de l'expression des marqueurs de surface. Les cellules perdent l'expression de c-Kit, marqueur des progéniteurs précoces, à partir du stade proérythroblaste. Elles acquièrent alors progressivement l'antigène Ter119, spécifique de la lignée érythroïde murine. Cet antigène a un spectre d'expression identique à celui de la Glycophorine A et est étroitement lié à celle-ci sur la membrane du globule rouge (Kina et al., 2000). Il est moyennement exprimé dans les proérythroblastes et érythroblastes basophiles, et fortement exprimé dans les derniers stades.

A l'inverse, le récepteur à la Transferrine, CD71 ou TfR1, est fortement exprimé dans les progéniteurs précoces et son expression diminue au cours de la maturation érythroïde. Ce n'est qu'après la sortie du cycle cellulaire, au stade réticulocyte, que son expression est arrêtée.

Ces deux marqueurs, CD71 et Ter119, peuvent être utilisés pour caractériser les différents stades terminaux de l'érythropoïèse, comme le montre l'**illustration 5** (Socolovsky et al., 2001; Zhang et al., 2003). D'autres équipes ont montré récemment que le CD44, dont l'expression diminue également

au cours de la maturation, peut être utilisé à la place du CD71 pour identifier les différentes populations (Chen et al., 2009).

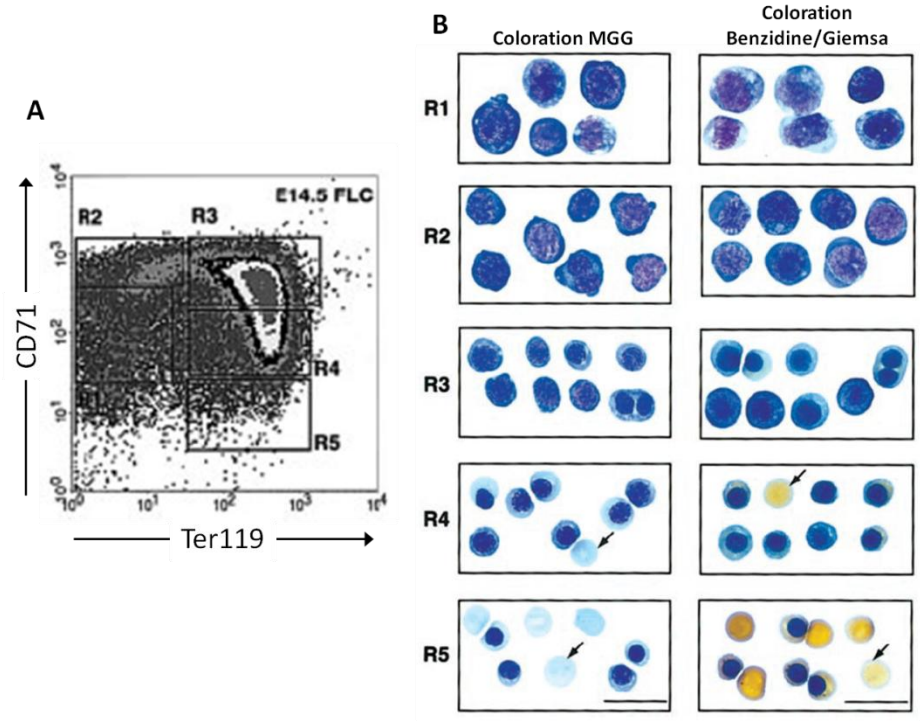


Illustration 5 : <u>Mise en évidence des différents stades de l'érythropoïèse selon les marqueurs de surface Ter119 et CD71 chez la souris</u> (Zhang et al., 2003)
A. Des cellules de foie fœtal à 14,5 jours de développement ont été triées en fonction de leur expression des marqueurs CD71 et Ter119 en cinq populations R1 à R5 comme le montre le diagramme de cytométrie. **B.** Chaque population a été caractérisée par des colorations MGG et Benzidine/Giemsa (colorant l'hémoglobine en jaune). **R1** : BFU-e et CFU-e ; **R2** : proérythroblastes ; **R3** : érythroblastes basophiles ; **R4** : érythroblastes polychromatophiles et acidophiles ; **R5** : érythroblastes acidophiles et réticulocytes. Les flèches indiquent les réticulocytes énucléés. Échelle : 20µm. **MGG** : May-Grünwald/Giemsa.

La différenciation des proérythroblastes en érythroblastes acidophiles s'effectue en quatre mitoses successives. Un proérythroblaste produit alors 16 érythroblastes acidophiles.

A la fin de ce processus, les érythroblastes acidophiles expulsent leur noyau. Ils deviennent alors des réticulocytes et entrent dans la circulation sanguine. En conditions physiologiques normales, le taux de réticulocytes circulants est de 2-3%. Ces cellules anucléées sont très riches en ARN et contiennent encore des ribosomes, des mitochondries et un peu de réticulum endoplasmique et d'appareil de Golgi. Leur contenu en ARN permet de les visualiser en microscopie en utilisant des colorants basiques (bleu de Crésyl, bleu de méthylène) ou en cytométrie de flux (Thiazole Orange). Deux à trois jours après l'énucléation, les réticulocytes se débarrassent des organelles restantes par autophagie et deviennent ainsi des érythrocytes matures capables d'exercer leur fonction de transporteurs de l'oxygène vers tous les tissus de l'organisme.

3. Le globule rouge : la cellule fonctionnelle

Le globule rouge, également appelé hématie ou érythrocyte, est la cellule sanguine la plus abondante. Elle doit son nom à sa couleur rouge due à son contenu en hémoglobine qui représente le tiers de sa masse totale. Elle a la forme d'un disque biconcave. Son diamètre est de 8 µm environ (**Illustration 6**). Sa forme particulière lui permet d'une part, d'avoir une plus grande surface par rapport à son volume que la forme sphérique, ce qui favorise les échanges d'oxygène, et d'autre part, d'avoir une plus grande déformabilité que la forme sphérique qui est plus rigide. Ceci permet son passage dans la microcirculation. A l'état normal, la forme et la taille des érythrocytes sont très homogènes et toute variation traduit une anomalie cellulaire. Les érythrocytes non conformes, ne pouvant se déformer pour passer dans les capillaires les plus fins et assurer leur fonction, sont éliminés par la rate.

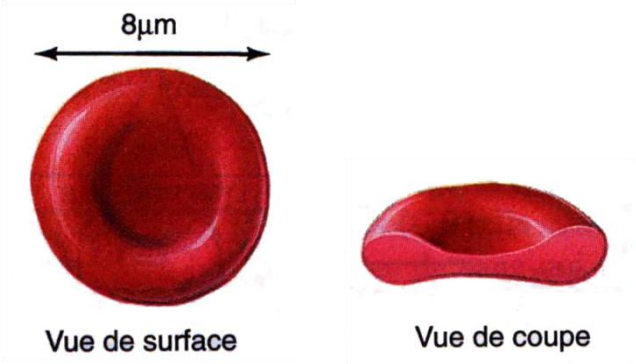


Illustration 6 : Le globule rouge
Le globule rouge, également appelé hématie ou érythrocyte, a la forme d'un disque biconcave d'environ 8µm de diamètre. Il doit sa couleur rouge à son contenu en hémoglobine.

Cette troisième partie détaillera les propriétés structurelles, métaboliques et fonctionnelles du globule rouge en suivant le déroulement de sa vie et son cheminement dans l'organisme. La vie du globule rouge débute dans la circulation sanguine, il est ensuite acheminé vers les poumons où il capte l'O_2 pour le transporter vers les autres tissus de l'organisme. Il est finalement détruit par la rate après environ 120 jours de vie chez l'homme ; 40 jours chez la souris. Enfin, un dernier paragraphe présentera succinctement les différentes pathologies du globule rouge.

3.1. La circulation sanguine – propriétés intrinsèques du globule rouge

Le globule rouge est unique parmi les cellules humaines : il est anucléé et ne contient aucun organite. La membrane plasmique, son unique composant structurel, assure ses différentes fonctions

mécaniques, antigéniques et de transport grâce à sa composition particulière qui sera détaillée dans un premier paragraphe. Un deuxième paragraphe présentera les propriétés caractéristiques permettant au globule rouge de résister aux aléas de la circulation sanguine. Enfin, le dernier paragraphe décrira rapidement le métabolisme érythrocytaire nécessaire à sa survie.

3.1.1. Composition et organisation de la membrane du globule rouge

L'organisation structurelle de la membrane du globule rouge lui permet de subir des déformations réversibles dans la circulation sanguine tout en conservant l'intégrité de sa structure. Une importante caractéristique de ces déformations est qu'elles n'impliquent pas de changement significatif de la taille de la surface membranaire : une augmentation de la surface cellulaire de 3 à 4% conduit à la lyse cellulaire. Malgré cela, un globule rouge normal peut se déformer avec une extension linéaire pouvant aller jusqu'à 250%, ce qui démontre une grande élasticité de la structure membranaire.

Ces propriétés inhabituelles sont dues à la structure composite de la membrane du globule rouge. Elle est en effet constituée d'une membrane plasmique reliée par des protéines transmembranaires à un réseau protéique élastique bidimensionnel, le squelette membranaire.

La membrane plasmique

La structure de la membrane plasmique est celle d'une membrane cellulaire classique : elle est constituée d'une bicouche lipidique où s'intercalent des protéines. La bicouche lipidique est composée en égales proportions de cholestérol et de phospholipides. Le cholestérol est distribué équitablement entre les deux couches, tandis que les phospholipides sont disposés de façon asymétrique.

Les protéines transmembranaires

Plus de 50 protéines transmembranaires ont été identifiées dans le globule rouge. Elles sont présentes en différentes quantités, allant de quelques centaines à un million de copies par cellule. Plus de la moitié d'entre elles portent les antigènes des différents groupes sanguins, comme notamment Band3, la glycophorine (GP) A, GPC, Rh, Rh-associated glycoprotein (RhAG), XK, Kell, Duffy, CD44, CD47, l'aquaporine 1 (AQP1), Lutheran (Lu) et ICAM-4 (intracellular adhesion molecule-4) (Reid and Mohandas, 2004).

Toutes ces protéines membranaires ont des fonctions diverses. Certaines assurent les échanges avec le milieu extérieur comme Band3 (échangeur Cl^-/HCO_3^-), l'aquaporine AQP-1 (transporteur d'eau), ou GLUT-1 (transporteur du glucose) (Liu et al., 2011). D'autres sont impliquées dans

l'adhésion cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire comme ICAM-4, Lu, ou CD44. D'autres, comme la protéine Duffy, sont des récepteurs aux chimiokines (Chaudhuri et al., 1994).

Le squelette membranaire

Le squelette membranaire est formé d'un réseau de protéines qui tapissent la face interne de la membrane plasmique. Il est relié à la membrane plasmique par des interactions avec les domaines cytoplasmiques des protéines transmembranaires. Une interaction directe de plusieurs protéines du squelette avec des lipides membranaires permet des ancrages supplémentaires. Le cœur structural du réseau squelettique est formé par les filaments d'α-spectrine et de β-spectrine. Ces filaments sont reliés entre eux par un complexe jonctionnel constitué d'actine, de protéine 4.1R, de tropomyosine, de dématine, d'adducine et de tropomoduline (Mohandas and Gallagher, 2008).

Les complexes membranaires

Il existe deux complexes macromoléculaires majeurs importants pour l'intégrité structurelle de la membrane reliant la membrane plasmique au squelette membranaire : un basé sur l'ankyrine R, l'autre sur la protéine 4.1R. L'ankyrine R interagit d'une part avec les domaines cytoplasmiques de Band3 et RhAG, et d'autre part avec la spectrine, pour former le « **complexe ankyrine R** » (Bruce et al., 2003). Ce complexe macromoléculaire contient également la protéine 4.2, GPA, Rh, CD47 et ICAM-4. La protéine 4.1R s'associe avec GPC, p55, Duffy, XK et Rh pour former le « **complexe 4.1R** » au niveau du complexe jonctionnel (Salomao et al., 2008). Des études récentes ont montré que 4.2, Band3 et GLUT-1 sont aussi localisées au niveau du complexe jonctionnel : 4.2 via son interaction avec l'α-spectrine, Band3 via son interaction avec l'adducine, et GLUT-1 par interaction avec l'adducine et la dématine (Liu et al., 2011).

Un modèle schématique représentant la composition et l'organisation des protéines de la membrane érythrocytaire est présenté en **Illustration 7**.

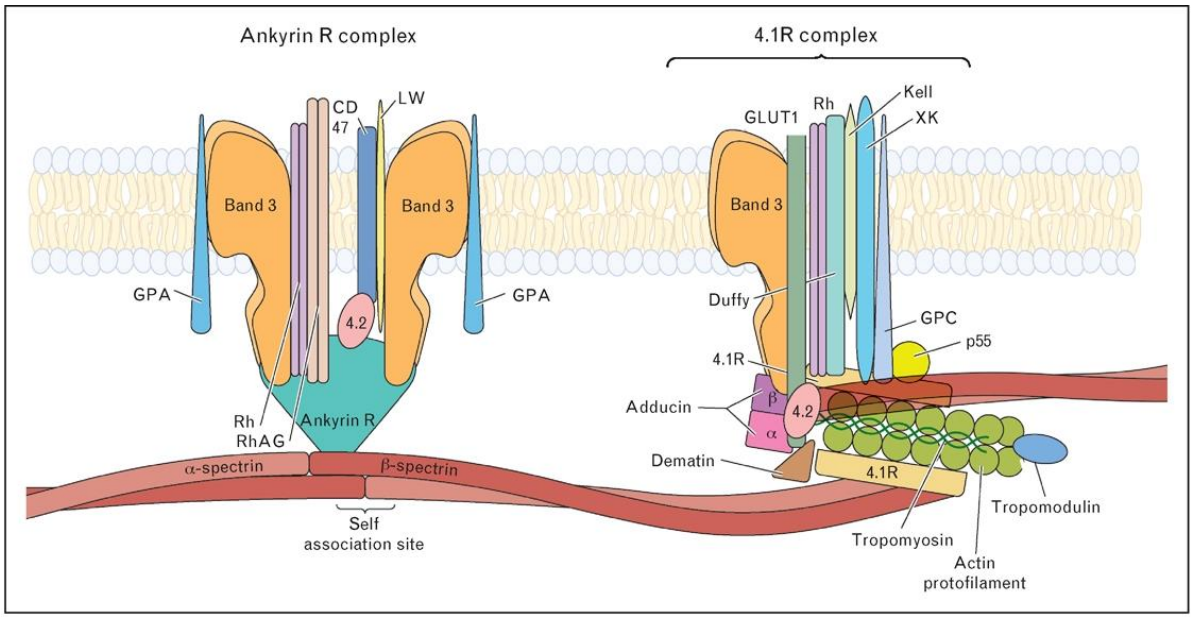


Illustration 7 : <u>Modèle schématique de l'organisation de la membrane érythrocytaire</u> (Liu et al., 2011)
La membrane du globule rouge est constituée d'une membrane plasmique reliée par des protéines transmembranaires à un réseau protéique élastique bidimensionnel formé principalement de spectrine, le squelette membranaire. Deux complexes macromoléculaires majeurs relient la bicouche lipidique au squelette membranaire : le **complexe Ankyrine R** et le **complexe 4.1R**. La composition membranaire de ces complexes est représentée.

3.1.2. <u>Propriétés constitutives de résistance du globule rouge</u>

En exerçant sa fonction de distributeur de l'oxygène aux tissus, le globule rouge subit des contraintes mécaniques continuellement au cours de sa vie sans être pour autant détérioré structurellement. Des études biophysiques étendues ont identifié trois caractéristiques constitutives du globule rouge comme étant les régulateurs majeurs de sa capacité à subir les déformations nécessaires : 1) la géométrie de la cellule, en particulier le ratio surface/volume cellulaire, 2) la viscosité cytoplasmique déterminée par la concentration intracellulaire en hémoglobine, 3) la déformabilité de la membrane.

Géométrie cellulaire

Le globule rouge biconcave normal possède un excédent de surface de 40% comparé à une sphère de même volume. Sans cet excédent, la cellule ne peut pas se déformer, car toute variation de l'état sphérique à volume constant implique une augmentation de la surface, que ne permettent pas les propriétés de la bicouche lipidique. Toute perte de surface par vésiculation, fragmentation cellulaire ou augmentation du volume cellulaire compromet la capacité de la cellule à se déformer et induit son élimination prématurée de la circulation.

Le maintien du volume cellulaire est assuré par divers transporteurs d'ions associés à la membrane. Le maintien de la surface membranaire est assuré par :

- la stabilité du squelette membranaire : elle dépend de l'intensité de l'interaction entre les filaments de spectrine (Liu and Palek, 1980) et des interactions qui définissent le complexe jonctionnel (Marchesi et al., 1990) ;
- une forte cohésion entre la bicouche et le squelette membranaire. Cette cohésion empêche la formation de vésicules, donc la perte de surface membranaire. Elle est assurée par le système de liaisons « verticales » décrit précédemment entre la bicouche lipidique et le squelette membranaire, notamment par les complexes « ankyrine R » et « 4.1R ». De plus, grâce à leurs interactions directes avec les protéines du squelette, les phosphatidyl-sérines (PS) et le PIP_2 contenus dans la bicouche peuvent réguler la fonction mécanique de la membrane. En effet, des études ont montré que les PS se lient aux spectrines α et β (Manno et al., 2002), et que le PIP_2 augmente l'interaction de la protéine 4.1R avec la β-spectrine (An et al., 2005).

Viscosité cytoplasmique

La capacité d'un globule rouge normal à changer rapidement sa forme en réponse aux contraintes d'écoulement de la circulation sanguine est gouvernée par la viscosité cytoplasmique. Celle-ci est déterminée par la concentration intracellulaire en hémoglobine.

Chez l'homme, en moyenne, la concentration cellulaire en hémoglobine d'un globule rouge normal est de 33 g/dL, mais d'une cellule à l'autre, elle peut varier de 27 à 37 g/dL. La viscosité d'une solution d'hémoglobine augmente fortement à partir de 37 g/dL (Mohandas and Chasis, 1993). C'est pourquoi une augmentation de la concentration d'hémoglobine au dessus de 37 g/dL diminue fortement la vitesse de récupération de la forme initiale de la cellule après des déformations (Evans et al., 1984). Ainsi, une augmentation de la viscosité cytoplasmique compromettra la capacité de la cellule à s'accommoder rapidement aux étroits capillaires de la microcirculation, ainsi que son efficacité à distribuer l'oxygène aux tissus.

La capacité du globule rouge à réguler sa concentration en hémoglobine dans des limites étroites, dépend de manière critique de sa capacité à contrôler son volume. Comme le volume du globule rouge est déterminé principalement par son contenu total en cation, les transporteurs ioniques jouent un rôle important dans la régulation de la viscosité cytoplasmique (Milanick and Hoffman, 1986; Brugnara, 1997; Lew and Bookchin, 2005).

Déformabilité membranaire

Une caractéristique unique de la membrane du globule rouge est sa grande élasticité, qui lui permet de répondre rapidement aux contraintes de la circulation sanguine. Le réseau squelettique,

en particulier la spectrine, a un rôle critique dans l'élasticité membranaire. En effet, des études ont montré que l'interaction entre les filaments de spectrine alterne entre les états ouvert et fermé en fonction de la déformation membranaire (An et al., 2002).

3.1.3. Métabolisme et enzymes érythrocytaires

Les besoins énergétiques du globule rouge sont faibles comparé à une cellule nucléée. Toutefois, l'absence d'organelles telles que la mitochondrie est palliée par tout un arsenal enzymatique chargé des besoins métaboliques du globule rouge. Ces systèmes enzymatiques participent à la survie et la fonction du globule rouge en fournissant l'énergie nécessaire pour maintenir l'intégrité de la membrane et donc sa forme biconcave, assurer les échanges membranaires avec le milieu extérieur, lutter contre les agents oxydants et assurer sa fonction de transporteur d'oxygène.

L'énergie du globule rouge provient entièrement de la dégradation du glucose (Illustration 8). La principale voie de dégradation du glucose est la **glycolyse anaérobie** (voie d'Embden-Meyerhoff) qui dégrade 90% du glucose. Pour chaque molécule de glucose dégradée, elle génère 2 molécules d'ATP alors que la glycolyse aérobie en produit 36. L'ATP est indispensable pour le fonctionnement des pompes du globule rouge, notamment les pompes à sodium (Na/K-ATPase). La glycolyse anaérobie produit également du NADH qui est essentiel pour maintenir le taux de méthémoglobine à un faible niveau : il sert de donneur d'ions d'hydrogène pour la réduction de la méthémoglobine en hémoglobine (voir § I.3.2.). Les enzymes clés de la glycolyse sont l'hexokinase, la phospho-fructo-kinase (PFK), la glycéraldéhyde-3-phospho-déshydrogénase (G3PDH) et la pyruvate-kinase. Le déficit de l'une de ces enzymes peut être responsable d'une anémie hémolytique héréditaire.

La voie accessoire qui dégrade 10% du glucose est la **voie des pentoses phosphates**. Elle se branche sur la voie principale au niveau du glucose-6-phosphate (G6P). Elle assure, entre autres, la formation de NADPH qui permet de lutter contre les agents oxydants. La production de NADPH dépend de la première étape de la voie impliquant la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD). Un déficit de cette enzyme entraîne également une anémie hémolytique.

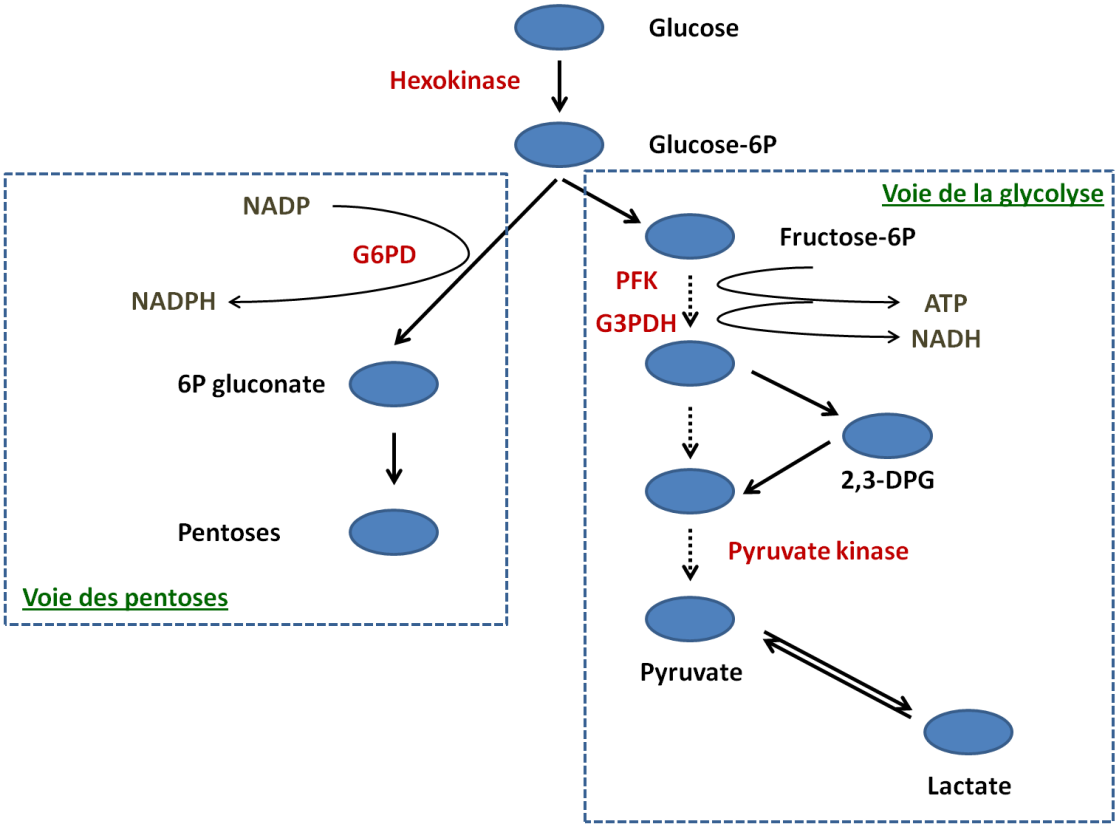


Illustration 8 : Le métabolisme du glucose
L'énergie du globule rouge provient de la dégradation du glucose. Celle-ci est effectuée par deux voies : la glycolyse et la voie des pentoses.

3.2. Les poumons – fonction du globule rouge

La fonction du globule rouge est de transporter l'oxygène, capté lors de la respiration, des poumons vers les autres tissus de l'organisme. Cette fonction est assurée par l'hémoglobine, le principal constituant du globule rouge. Elle représente en effet 30% de sa masse totale.

L'**hémoglobine** est une protéine tétramérique formée de quatre chaînes de globine, chacune couplée à une molécule d'hème.

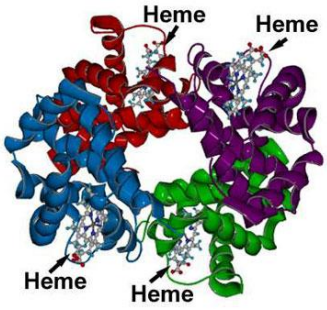


Illustration 9 : La molécule d'hémoglobine
L'hémoglobine est le principal constituant du globule rouge. Elle permet le transport de l'oxygène. L'hémoglobine est une protéine tétramérique constituée de quatre chaînes de globine, chacune couplée à une molécule d'hème. Chaque molécule d'hème contient un ion Fer qui permet la liaison à l'O_2.

L'**hème** est une structure aromatique appelée porphyrine, constituée de 4 noyaux pyrrol, contenant en son centre un ion fer. Le fer établit six liaisons, quatre avec les atomes d'azote de la porphyrine, et deux avec les acides aminés de la globine. Il peut se trouver sous deux formes : le fer ferreux réduit (Fe^{2+}) et le fer ferrique oxydé (Fe^{3+}). L'hémoglobine contenant le Fe^{2+} est capable d'établir une liaison réversible avec l'O_2 : elle est alors appelée « oxyhémoglobine ». Lorsque le fer est sous sa forme oxydée Fe^{3+}, on parle de « méthémoglobine ». La méthémoglobine est incapable de transporter l'oxygène. Elle est formée naturellement dans la cellule mais nécessite un système de régulation pour maintenir son taux faible (1 à 2% de l'hémoglobine totale). Celui-ci est assuré par la méthémoglobine réductase à NADH. En l'absence de cette enzyme, il existe une voie accessoire utilisant la méthémoglobine réductase à NADPH. Ces deux enzymes assurent la re-transformation de la méthémoglobine inactive en hémoglobine apte au transport de l'O_2.

La **globine** est la partie protéique de l'hémoglobine. Chaque molécule d'hémoglobine est formée de quatre chaînes de globine. Chez l'homme, il existe différents types de globines, qui varient au cours du développement. Chez l'embryon, on trouve les globines α, ϵ, ζ et γ qui forment différents tétramères d'hémoglobine : ($\zeta_2\epsilon_2$), ($\zeta_2\gamma_2$), ($\alpha_2\epsilon_2$). Ceux-ci sont ensuite remplacés par l'hémoglobine fœtale, HbF, constituée de 2 chaînes α et 2 chaînes γ ($\alpha_2\gamma_2$). Enfin, chez l'adulte, il existe deux types d'hémoglobine. L'hémoglobine majoritaire, HbA_1, est constituée de 2 chaînes α et 2 chaînes β ($\alpha_2\beta_2$) et représente plus de 95% de l'hémoglobine totale. L'HbA_2 est composée de 2 chaînes α et 2 chaînes δ ($\alpha_2\delta_2$). Chez la souris, il n'existe pas d'hémoglobine fœtale, on passe directement des hémoglobines embryonnaires aux hémoglobines de type adulte HbA_{maj} et HbA_{min}.

3.3. La rate, le foie et la moelle osseuse – destruction des globules rouges ou érythrophagocytose

La durée de vie moyenne des globules rouges est de 120 jours chez l'homme et 40 jours chez la souris. Ils sont ensuite détruits par des cellules phagocytaires : les macrophages. Ces macrophages sont stationnés dans les capillaires de la rate principalement, mais également dans le foie et la moelle osseuse.

Arrivés au terme de leur vie, les érythrocytes sénescents sont porteurs d'anomalies de structure et de morphologie. La perte de l'élasticité membranaire les immobilise dans les capillaires et les exposent aux macrophages. Les phosphatidyl-sérines (PS) de la membrane plasmique, habituellement confinées sur la face interne, sont exposées sur la couche externe et reconnues par les macrophages. Cette perte d'asymétrie conduisant à l'exposition des PS est d'ailleurs supposée jouer un rôle dans la destruction prématurée des érythrocytes thalassémiques et drépanocytaires

(Kuypers et al., 1998; Yasin et al., 2003). Les macrophages reconnaissent également des clusters de Band3 sur la membrane (Low et al., 1985).

L'hémolyse physiologique est intra-tissulaire donc extra-vasculaire : l'hémoglobine n'est donc pas libérée dans les vaisseaux sanguins. Lorsque les globules rouges sont phagocytés par les macrophages, la membrane est digérée et l'hémoglobine libérée est aussitôt dégradée par les enzymes du macrophage. Les acides aminés de la globine sont récupérés par l'organisme, le fer est stocké dans les macrophages, puis réutilisé, et le reste de l'hème (la porphyrine) est transformé en bilirubine. La bilirubine libre se lie à l'albumine, passe dans le sang, est transformée par le foie en bilirubine conjuguée puis éliminée sous forme de stercobilinogène.

3.4. Pathologies du globule rouge

Il existe deux types de pathologies affectant les globules rouges : les polyglobulies et les anémies. Les **polyglobulies** sont définies par un excès d'érythrocytes. Elles sont dues à une augmentation de la production d'érythrocytes due à une suractivation des voies de signalisation. Cette suractivation peut être de cause intrinsèque à la cellule comme dans la polyglobulie de Vaquez où elle est due dans la majorité des cas (>80%) à une mutation de la protéine JAK2 (JAK2-V617F) (James et al., 2005). On parle alors de polyglobulie primitive. Dans d'autres cas, la suractivation peut être due à une augmentation du taux d'Epo circulante qui va alors stimuler de façon aberrante la production érythrocytaire. On parle alors de polyglobulie secondaire.

Les **anémies** sont caractérisées par un déficit en globules rouges. Ce chapitre détaillera les différents types d'anémies existants ainsi que leurs causes, après avoir présenté les principales constantes érythrocytaires.

3.4.1. Constantes érythrocytaires

Lors d'une numération sanguine, différents paramètres sont mesurés :

- le **Taux d'Hémoglobine** : il définit la présence d'une anémie.
- le **Nombre d'érythrocytes**,
- l'**Hématocrite** : elle correspond au pourcentage relatif du volume des cellules circulant dans le sang par rapport au volume total de sang.

Ces trois paramètres serviront ensuite à calculer les constantes suivantes :

- **Volume Globulaire Moyen** (VGM) : il représente la taille des érythrocytes, et correspond au rapport Hématocrite / Nb d'érythrocytes.

- **Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine** (CCMH) : c'est la concentration moyenne d'hémoglobine par érythrocyte. Elle est calculée par le rapport Taux d'Hb / Hématocrite.
- **Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine** (TCMH) : elle représente la quantité d'hémoglobine moyenne contenue dans un érythrocyte, et correspond au rapport Taux d'Hb / Nb d'érythrocytes.

Le **taux de réticulocytes** peut également être mesuré, il reflète la production nouvelle d'érythrocytes.

3.4.2. Classification des anémies

L'anémie est définie par une diminution du taux d'hémoglobine sanguin. Le taux d'hémoglobine minimal est de 13 g/dL chez l'homme, et 12 g/dL chez la femme. Chez la souris, il dépend du fond génétique et de l'âge des individus.

Il existe différents types d'anémies ayant des causes multiples qui sont résumées dans l'**illustration 10**. Ces anémies peuvent être dues :

- à une production insuffisante d'érythrocytes : on parle alors d'anémie arégénérative. Dans ce cas, l'érythropoïèse est insuffisante et le taux de réticulocytes est inférieur à la normale (<2,5%) ;
- à une perte ou une destruction accélérée des globules rouges : on parle alors d'anémie régénérative. Dans ce cas, l'érythropoïèse est efficace et stimulée par le stress érythroïde, le taux de réticulocytes est alors supérieur à la normale (>2,5%).

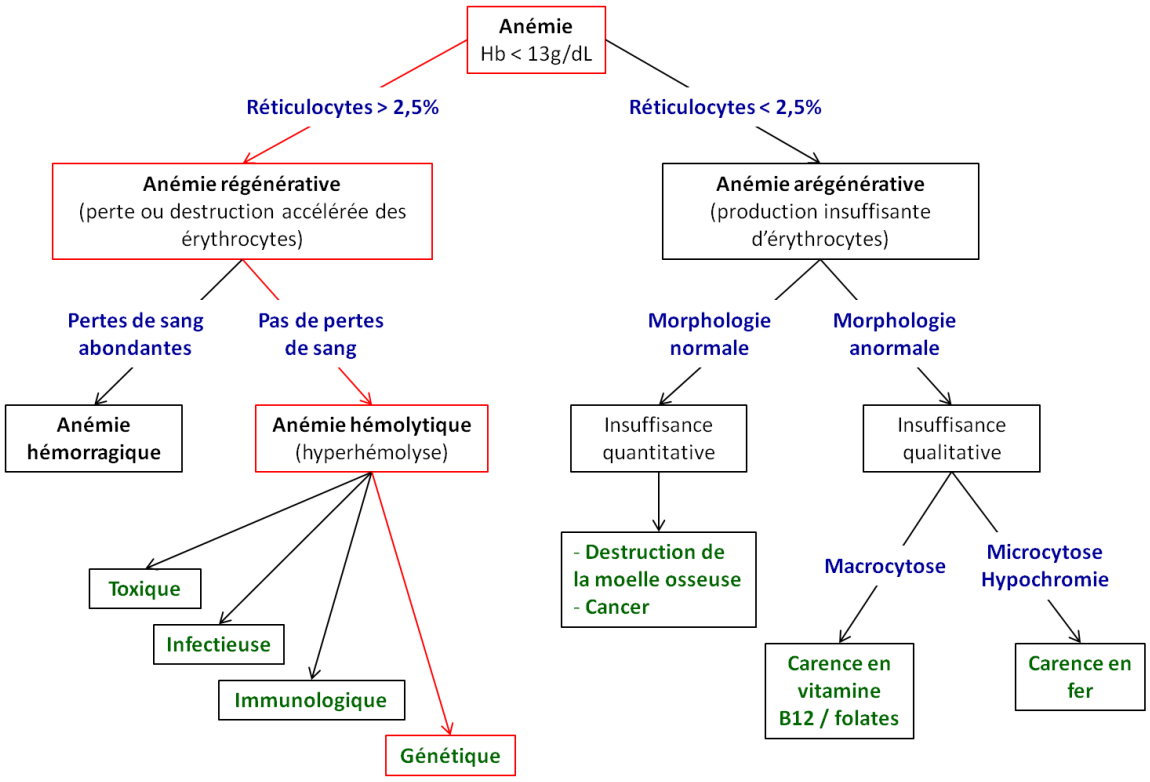


Illustration 10 : <u>Classification des anémies</u>
L'anémie est définie par une diminution du taux d'hémoglobine sanguin en dessous de 13g/dL chez l'homme. Elle peut être due 1) à une perte ou une destruction accélérée des globules rouges, la production d'érythrocytes est normale, l'anémie est dite régénérative ; 2) à une production insuffisante de globules rouges, on parle alors d'anémie arégénérative. Les différents types d'anémie, leurs caractéristiques (en bleu) ainsi que leurs causes (en vert) sont résumés dans ce schéma.

Nous nous intéresserons ici aux anémies régénératives, et plus particulièrement à celles causées par une hyperhémolyse.

L'hyperhémolyse correspond à une augmentation de la lyse de globules rouges dont la durée de vie est alors raccourcie. L'érythropoïèse est alors accélérée pour permettre le renouvellement plus rapide des globules rouges. Une anémie apparaît si la demande est trop importante. L'hyperhémolyse est caractérisée par une augmentation des taux de Lactate Déshydrogénase (LDH), abondante dans les globules rouges, et de bilirubine, produit de la dégradation de l'hème. Elle peut être d'origine toxique (venin de serpent, intoxication au cuivre ou au plomb), d'origine infectieuse parasitaire (paludisme) ou bactérienne (septicémie), d'origine immunologique (maladie auto-immune ou incompatibilité fœto-maternelle liée au facteur Rhésus) ou d'origine génétique.

Plusieurs défauts génétiques peuvent induire une hyperhémolyse. Elle peut être due à un déficit enzymatique. Les déficits en Pyruvate Kinase ou en G6PD (Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase) sont les plus fréquents. Le déficit en Pyruvate Kinase est caractérisé par une échinocytose, un défaut morphologique de la membrane du globule rouge.

L'hyperhémolyse est également une caractéristique des hémoglobinopathies comme les thalassémies ou la drépanocytose dues à des mutations des gènes de globines.

Des mutations des gènes codant pour des protéines de la membrane du globule rouge peuvent aussi induire une anémie hémolytique. Elle est alors associée à des anomalies morphologiques. C'est le cas, par exemple, de la sphérocytose héréditaire qui est caractérisée par la présence de globules rouges sphériques (sphérocytes) dans le sang. La forme sphérique observée est due à une perte de la surface membranaire causée par une mauvaise cohésion membranaire. Celle-ci s'explique par des déficiences de protéines membranaires comme Band3 ou RhAG, ou de protéines du squelette comme l'ankyrine, la protéine 4.2 ou la spectrine (Jarolim et al., 1996; Hassoun et al., 1997; Eber and Lux, 2004).

Une étude plus récente a montré qu'une anémie hémolytique est associée à une pathologie neurologique causée par une mutation du transporteur de glucose GLUT-1 (**Illustration 11**). Cette anémie est caractérisée par la présence d'échinocytes, des globules rouges dont la membrane est crénelée. L'échinocytose serait due à l'augmentation de la perméabilité aux cations (Na^+, K^+, Ca^{2+}) des érythrocytes causée spécifiquement par cette mutation de GLUT-1 (Weber et al., 2008).

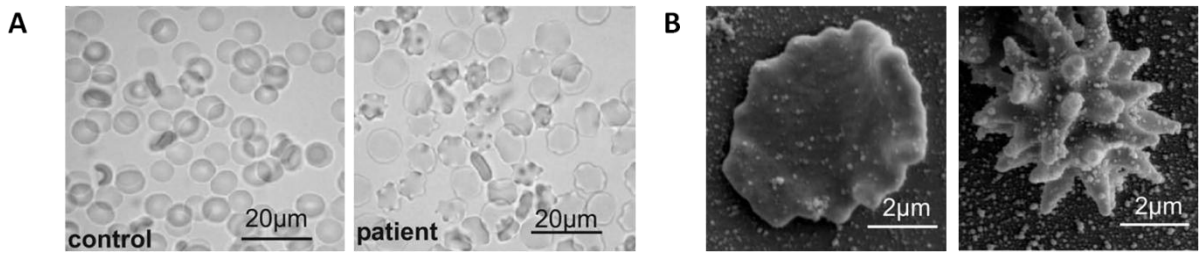


Illustration 11 : <u>Une morphologie anormale des globules rouges : l'échinocytose</u> (Weber et al., 2008)
Une mutation du transporteur de glucose GLUT-1 entraîne une anémie hémolytique avec échinocytose. Les échinocytes sont des globules rouges morphologiquement anormaux dont la membrane est crénelée. **A.** Frottis sanguins d'un individu sain (control) et d'un patient porteur de la mutation (patient). L'échantillon du patient présente une grande quantité d'échinocytes. **B.** Deux échinocytes provenant du patient sont visualisés par microscopie électronique.

II. Les facteurs moléculaires régulant l'érythropoïèse

L'érythropoïèse est régulée par de nombreux facteurs moléculaires que l'on peut classer en deux groupes : 1) les cytokines, hormones et molécules de signalisation cellulaire, 2) les facteurs de transcription.

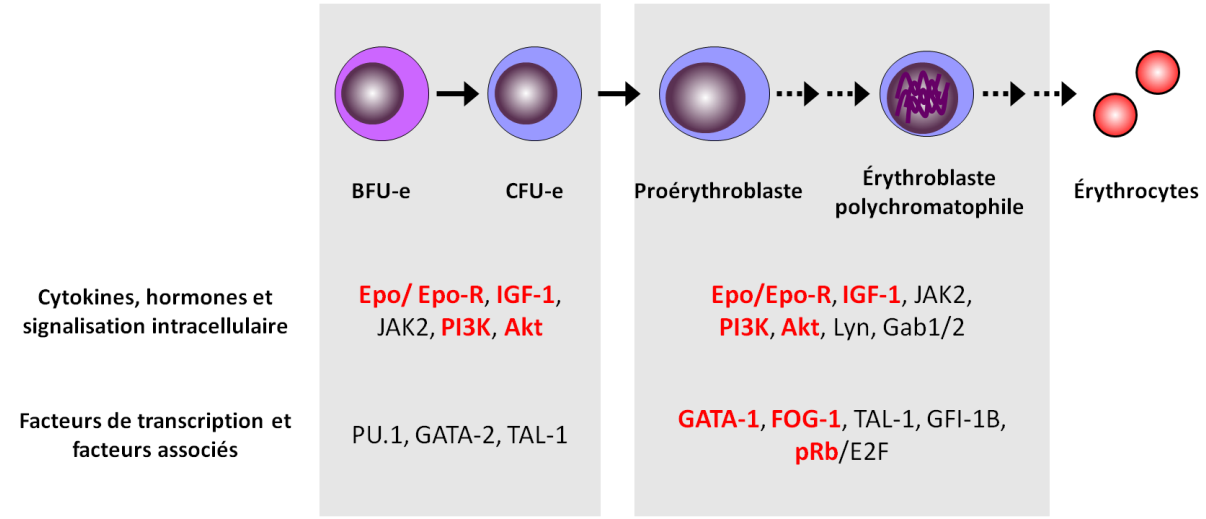


Illustration 12 : <u>Les facteurs moléculaires régulant l'érythropoïèse</u> (adapté de Vicente et al., 2012)
L'érythropoïèse est régulée par deux types de facteurs : 1) les cytokines, hormones et les molécules de signalisation, 2) les facteurs de transcription et les facteurs associés. Les principaux facteurs nécessaires aux différents stades de l'érythropoïèse sont indiqués. Les facteurs qui seront présentés en détail dans ce chapitre sont indiqués en rouge.

De manière schématique, les molécules de signalisation sont exprimées de façon ubiquitaire et ont souvent été impliquées dans le contrôle de la survie et de la prolifération cellulaire. A l'inverse, les facteurs de transcription sont généralement spécifiques d'un lignage cellulaire et jouent un rôle dans les processus de différenciation.

Aujourd'hui, plusieurs éléments suggèrent des interconnexions entre ces deux grands mécanismes. Certaines voies de signalisation semblent avoir un rôle dans la différenciation érythroïde. Le laboratoire a d'ailleurs mis en évidence un lien direct entre la signalisation Epo/PI3K/Akt et le facteur de transcription érythroïde GATA-1.

Ce second chapitre s'articulera en deux parties. La première partie présentera les cytokines ou hormones et la signalisation cellulaire qui régulent l'érythropoïèse en détaillant plus particulièrement la voie Epo/PI3K/Akt. Un bref chapitre concernera le rôle de l'IGF-1. La seconde partie sera consacrée au facteur de transcription majeur de l'érythropoïèse GATA-1 et à ses cofacteurs.

1. Les cytokines, hormones et la signalisation intracellulaire

L'efficacité de l'érythropoïèse dépend de la présence et de l'action coordonnée de nombreux facteurs de croissance assurant la survie, l'expansion et la maturation des progéniteurs érythroïdes. Parmi ces facteurs, on trouve des cytokines hématopoïétiques comme l'interleukine-1 (IL-1), l'IL-3, l'IL-4, l'IL-9, l'IL-11, le Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), et la Thrombopoïétine (TPO). L'IL-3 agit, en synergie avec le GM-CSF, sur la prolifération des progéniteurs multipotents et des BFU-e. L'IL-9 et l'IL-11 permettent la prolifération des BFU-e mais également la maturation des CFU-e. La TPO, en conjugaison avec d'autres cytokines, permet d'augmenter la prolifération des progéniteurs érythroïdes (Birkmann et al., 1997).

D'autres facteurs non hématopoïétiques comme l'Insuline et l'Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) ont un rôle dans l'érythropoïèse. En effet, il a été montré que l'Insuline et/ou l'IGF-1 sont nécessaires au développement correct des CFU-e humaines *in vitro* (Sawada et al., 1989; Boyer et al., 1992), et qu'ils stimulent tous deux la prolifération des BFU-e tardives et CFU-e (Miyagawa et al., 2000). Le rôle de l'IGF-1 sera plus amplement détaillé dans le paragraphe II.1.4.

De plus, les glucocorticoïdes, hormones lipophiles régulant divers processus physiologiques, semblent également jouer un rôle dans l'érythropoïèse. En effet, *in vitro*, ils permettent la formation de colonies érythroïdes murines (Golde et al., 1976) et augmentent la prolifération des cellules érythroïdes en présence de faibles quantités d'Epo (Udupa et al., 1986). De plus, une étude *in vivo* a montré que le récepteur aux glucocorticoïdes (Glucocorticoid Receptor – GR) est essentiel à l'expansion des progéniteurs érythroïdes immatures pendant l'érythropoïèse de stress induite par hémolyse ou hypoxie (Bauer et al., 1999).

Il existe également des cytokines inhibant l'érythropoïèse telles que le Tumor Necrosis Factor α (TNFα) et l'interféron γ qui, libérés par les macrophages au cours de la réponse inflammatoire, ont une action négative sur la prolifération des CFU-e et des proérythroblastes.

Cependant, les deux principales cytokines ayant un rôle essentiel dans l'érythropoïèse sont le Stem Cell Factor (SCF) et l'érythropoïétine (Epo).

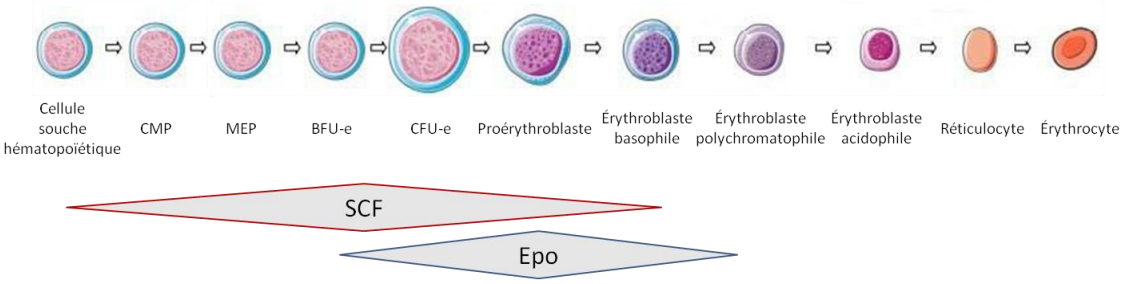


Illustration 13 : <u>Epo et SCF : les deux cytokines majeures de l'érythropoïèse</u> (d'après Courtois et al., 2007)
L'érythropoïèse est régulée principalement par le Stem Cell Factor (SCF) et l'érythropoïétine (Epo). Le SCF induit des signaux de survie et de prolifération permettant l'expansion des progéniteurs précoces. L'Epo agit dès le stade BFU-e pour stimuler la prolifération, la survie et la différenciation des progéniteurs érythroïdes.

Le SCF est une cytokine hématopoïétique qui agit via son récepteur spécifique c-Kit pour induire des signaux de survie et retarder la différenciation permettant ainsi la prolifération et l'expansion des progéniteurs érythroïdes immatures (Muta et al., 1995).

Le rôle de l'érythropoïétine dans l'érythropoïèse sera détaillé dans la suite de ce chapitre.

1.1. <u>L'érythropoïétine et son récepteur</u>

L'**érythropoïétine** (Epo) est le principal régulateur de l'érythropoïèse. Elle agit sur la survie, la prolifération et la différenciation des progéniteurs érythroïdes. C'est une glycoprotéine de 34kDa, purifiée pour la première fois en 1977 à partir d'urine de patients anémiques (Miyake et al., 1977). La plupart des facteurs de croissance hématopoïétiques sont produits constitutivement et agissent localement. L'Epo, en revanche, est l'un des deux facteurs de croissance hématopoïétiques, avec la thrombopoïétine, se comportant comme une hormone. Elle est en effet produite par le rein et agit sur les progéniteurs érythroïdes dans la moelle osseuse (Spivak, 2005).

Au cours du développement embryonnaire, l'Epo est d'abord produite par le foie. Le rein prend progressivement le relais pour devenir, chez le mammifère adulte, le principal organe producteur d'Epo (Koury et al., 1988). La production d'Epo est régulée au niveau transcriptionnel par le taux d'oxygène fourni aux organes. En effet, l'hypoxie, via le facteur HIF1 (Hypoxia-inducible factor 1), est le seul régulateur physiologique de l'expression du gène de l'érythropoïétine. En cas d'hypoxie tissulaire, HIF1α entre dans le noyau, se dimérise avec HIF1β et transactive, entre autres, le gène de l'érythropoïétine (Jewell et al., 2001). L'augmentation de la production d'Epo permet alors l'augmentation de la production d'érythrocytes. La fin de l'hypoxie (normoxie, ou en cas d'hyperoxie), ou l'augmentation de la viscosité sanguine induit une diminution de la production d'Epo. Il n'existe pas de stockage de l'Epo. Une augmentation du taux d'Epo sérique représente

l'entrée dans la circulation sanguine d'hormone nouvellement synthétisée. Comme beaucoup de facteurs de croissance hématopoïétiques, l'Epo est métabolisée par ses cellules cibles après liaison à son récepteur et internalisation.

L'Epo agit sur ses cellules cibles via son récepteur spécifique : le **récepteur à l'Epo** (Epo-R). Ce dernier est exprimé dans les progéniteurs érythroïdes de la moelle osseuse, ainsi que dans plusieurs tissus non-hématopoïétiques comme les myocytes, les neurones corticaux et les épithéliums prostatiques, mammaires et ovariens (Richmond et al., 2005). Dans le lignage érythroïde, l'Epo-R est exprimé à la surface des progéniteurs dès le stade BFU-e mature. Son expression augmente au cours de la différenciation, elle est maximale aux stades CFU-e et proérythroblaste puis diminue et disparaît au stade érythroblaste polychromatophile (Spivak, 2005).

Le récepteur à l'Epo appartient à la famille des récepteurs aux cytokines de classe I (Mayeux et al., 1990). Ces récepteurs possèdent un domaine transmembranaire unique et un domaine cytoplasmique dépourvu d'activité tyrosine kinase intrinsèque. Celle-ci est assurée par la protéine Janus Kinase 2 (JAK2), associée de manière constitutive au domaine intracellulaire du récepteur. Le domaine cytoplasmique contient 8 résidus Tyrosine.

L'Epo-R existe à l'état dimérisé à la surface des cellules. La fixation de l'Epo sur son récepteur entraîne un changement conformationnel conduisant à l'activation des protéines JAK2 par trans-phosphorylation. Les protéines JAK2 ainsi activées vont phosphoryler les tyrosines du domaine intracellulaire de l'Epo-R qui serviront alors d'ancrage à plusieurs protéines à domaine SH2 (Src homology 2) telles que STAT5a/b, SHP1, SHP2, SHIP, la sous-unité régulatrice p85α de la PI3K, Grb2, la tyrosine kinase Lyn, ainsi que les régulateurs négatifs de la signalisation SOCS (Suppressor of Cytokine Signaling). Ces protéines seront à leur tour activées par phosphorylation, entraînant l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaire, notamment les voies STAT5, Ras/MAPK, et PI3K/Akt.

Le couple Epo/Epo-R joue un rôle essentiel dans l'érythropoïèse. En effet, des souris invalidées pour le gène de l'Epo ($Epo^{-/-}$) ou de l'Epo-R ($Epo\text{-}R^{-/-}$) présentent une érythropoïèse primitive réduite et meurent à 13 jours de développement embryonnaire (E13) d'une sévère anémie. L'Epo et l'Epo-R sont donc indispensables à l'érythropoïèse définitive. Les foies fœtaux de ces souris contiennent des BFU-e et CFU-e. L'Epo et l'Epo-R ne sont donc pas essentiels à l'engagement dans la lignée érythroïde ni à la prolifération et la différenciation des progéniteurs précoces. Ils sont par contre nécessaires à la prolifération et la survie des CFU-e ainsi qu'à leur différenciation terminale (Wu et al., 1995b).

1.2. Les voies de signalisation activées par le couple Epo/Epo-R

1.2.1. Description générale

Dans le lignage érythroïde, le couple Epo/Epo-R induit la survie, la prolifération et la différenciation des progéniteurs par l'activation d'un certain nombre de voies de signalisation telles que la PLCγ, PI3K/Akt, Src/Lyn, Grb2/Ras/MAPK, JAK2/STAT5. Ces différentes voies de signalisation sont résumées dans l'**illustration 14**.

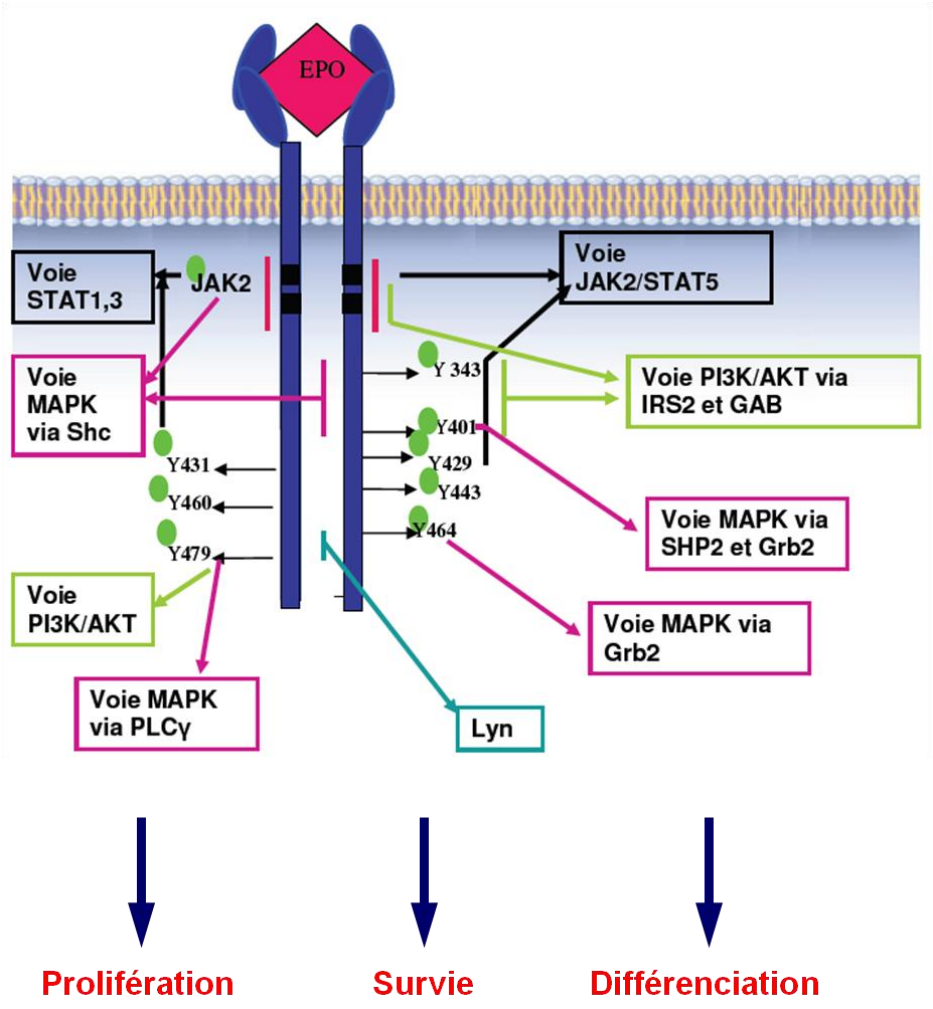


Illustration 14 : Principales voies de signalisation activées par le couple Epo/Epo-R
Le couple Epo/Epo-R induit la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire via diverses voies de signalisation. La fixation de l'Epo sur son récepteur Epo-R conduit à la phosphorylation (ovale vert) des protéines JAK2 qui elles-mêmes phosphorylent les 8 résidus Tyrosine (Y) du récepteur. Ceci permet alors l'activation des différentes voies de signalisation comme les voies JAK2/STAT (cadre en noir), Ras/MAPK (cadre rose) ou PI3K/Akt (cadre vert).

Dans ce travail, nous nous focaliserons plus particulièrement sur le rôle de la voie PI3K/Akt.

1.2.2. La voie PI3K / Akt

Il existe trois classes différentes de Phosphatidylinositol 3-Kinases (**PI3K**). Jusqu'à présent, seules les isoformes de classe I ont été impliquées dans l'hématopoïèse. Les PI3K de classe IB étant uniquement exprimées dans les leucocytes (Vanhaesebroeck and Waterfield, 1999), nous nous intéresserons ici aux PI3-Kinases de classe IA.

Les PI3K de classe IA sont constituées d'une sous-unité régulatrice (p85) et d'une sous-unité catalytique (p110). Dans les progéniteurs érythroïdes stimulés par l'Epo, elles peuvent être activées par trois voies alternatives indépendantes : 1) par l'association directe de la sous-unité p85α sur la Tyrosine 479 phosphorylée de l'Epo-R, 2) par le recrutement et la phosphorylation de la protéine Gab via les Tyr343 ou Tyr401 de l'Epo-R, 3) par la phosphorylation de la protéine adaptatrice IRS-2 (Insulin Receptor Substrate-2) (Bouscary et al., 2003). Quel que soit le mécanisme, l'activation de la PI3K est essentielle pour l'érythropoïèse puisque des souris qui n'expriment pas la p85α présentent une érythropoïèse réduite avec une diminution du nombre de BFU-e et CFU-e (Huddleston et al., 2003).

L'activation de la PI3K transforme le PIP_2 en PIP_3 qui permet le recrutement à la membrane et la phosphorylation de la Sérine/Thréonine kinase **Akt** (ou PKB pour Protein Kinase B). Le recrutement s'effectue via PDK1 (3-Phosphoinositides-Dependant Kinase 1) qui colocalise avec Akt à la membrane plasmique via son domaine PH (Pleckstrin Homology domain), tandis que le PIP_3 est nécessaire à l'exposition des sites de phosphorylation. Akt est alors phosphorylé sur la Thr308 et la Ser473. Ainsi activé, il est ensuite transloqué vers le cytoplasme puis vers le noyau. Akt va alors phosphoryler à son tour ses différentes cibles de manière à les activer ou au contraire les inhiber (Thompson and Thompson, 2004).

La voie PI3K/Akt est impliquée dans plusieurs processus indispensables à la cellule comme la régulation de la prolifération, la survie, le métabolisme, la réorganisation du cytosquelette ou le trafic membranaire. De nombreuses études ont montré que sa dérégulation est impliquée dans une grande variété de cancers, notamment des leucémies (Ringshausen et al., 2002; Kubota et al., 2004; Silva et al., 2008). Les composants de cette voie sont d'ailleurs considérés comme des cibles thérapeutiques prometteuses contre les leucémies (Martelli et al., 2006; Polak and Buitenhuis, 2012). Dans le lignage érythroïde, elle a été montrée comme impliquée dans la survie et la prolifération cellulaire, mais également dans la différenciation érythroïde.

Survie

Plusieurs études montrent l'importance de la voie PI3K/Akt dans la survie des cellules érythroïdes. Une étude de Haseyama et al. montre que le LY294002, inhibiteur de la PI3K, induit l'apoptose des

CFU-e humaines, suggérant un rôle anti-apoptotique de la PI3K (Haseyama et al., 1999). Une autre étude faite sur des progéniteurs érythroïdes précoces humains montre que l'effet positif de l'Epo sur la survie des cellules est totalement bloqué par le LY294002 (Myklebust et al., 2002). L'effet de la voie PI3K/Akt sur la survie cellulaire s'exerce par plusieurs mécanismes complémentaires.

D'une part, Akt permet la survie cellulaire en phosphorylant directement des régulateurs de l'apoptose, comme par exemple la protéine pro-apoptotique **Bad**. Bad est une protéine de la famille Bcl-2, contenant un domaine BH-3 (Bcl-2 Homology Domain 3). Ce domaine permet l'activation d'autres protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 telles que Bax ou Bak. Akt phosphoryle Bad sur la Ser136. Cette phosphorylation entraîne la séquestration cytoplasmique de Bad par les protéines 14-3-3, empêchant ainsi son interaction à la membrane mitochondriale avec les protéines Bcl-2 ou Bcl-X_L. Il en résulte une inhibition de l'apoptose (Zha et al., 1996; Datta et al., 1997; Thompson and Thompson, 2004). Akt phosphoryle également la protéine **Mdm2**. Mdm2 est une ubiquitine ligase E3 permettant l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome du suppresseur de tumeur p53. Cette phosphorylation permet la translocation vers le noyau et l'activation de Mdm2, assurant ainsi la down-régulation de p53, empêchant les arrêts du cycle (checkpoints) p53-dépendants et inhibant l'apoptose (Zhou and Hung, 2002). D'autre part, Akt permet également la survie cellulaire en régulant positivement ou négativement l'activité de différents facteurs de transcription. En effet, les facteurs NF-kB ou CREB, par exemple, sont activés par la voie PI3K/Akt, conduisant ainsi à l'augmentation de la transcription de gènes anti-apoptotiques comme cIAP1, cIAP2, Bcl-2 ou mcl-1 (Nicholson and Anderson, 2002).

Une autre cible d'Akt est le facteur de transcription **FoxO3A** (Forkhead box O3A) ou FKHR-L1. FoxO3A a un rôle pro-apoptotique. Il active en effet la transcription de gènes pro-apoptotiques tels que Bim et FasL (Brunet et al., 1999; Dijkers et al., 2000a), mais également l'inhibiteur du cycle cellulaire $p27^{KIP1}$(Dijkers et al., 2000b), ou le facteur anti-prolifératif BTG1 (B cell Translocation Gene 1) (Bakker et al., 2004). Tous les membres de la famille FoxO possèdent trois sites de phosphorylation par Akt. La phosphorylation de FoxO3A par Akt modifie sa localisation intra-cellulaire. En l'absence d'Akt activé, FoxO3A est principalement localisé dans le noyau, où il exerce son activité transcriptionnelle. L'activation de la voie PI3K/Akt induit son export du noyau. En effet, les protéines FoxO3A phosphorylées dans le noyau interagissent spécifiquement avec les protéines 14-3-3 qui servent alors de molécules chaperonnes pour les escorter hors du noyau. Une fois dans le cytoplasme, les protéines FoxO3A sont alors dégradées par la voie ubiquitine-protéasome (Plas and Thompson, 2003; Van Der Heide et al., 2004). La phosphorylation de FoxO3A par la voie PI3K/Akt en réponse à l'Epo, et son rôle anti-apoptotique a été montrée dans la lignée érythroleucémique UT-7/Epo ainsi que dans des progéniteurs érythroïdes primaires humains CD34+ (Kashii et al., 2000; Uddin et al., 2000). FoxO3A semble d'ailleurs jouer un rôle important au cours de l'érythropoïèse car

des souris déficientes pour ce gène (*Foxo3a*$^{-/-}$) présentent une anémie associée à un nombre élevé de réticulocytes (réticulocytose) (Castrillon et al., 2003).

Une autre cible d'Akt est la Sérine/Thréonine kinase Glycogen Synthase Kinase-3 (**GSK-3**). La GSK-3 est impliquée dans de nombreux processus cellulaires et joue notamment un rôle important dans le métabolisme en inactivant par phosphorylation la glycogène synthase, et dans le cycle cellulaire en induisant la dégradation de la cycline D1. L'activité de la GSK-3 semble être régulée par Akt. En effet, une étude de Cross et al. a montré qu'en réponse à l'insuline, la voie PI3K/Akt phosphoryle la GSK-3, réduisant ainsi son activité (Cross et al., 1995). Par ailleurs, une étude de Somervaille et al. a montré que la GSK-3 semblait impliquée dans l'apoptose des progéniteurs érythroïdes humains CD34+ induite en absence de facteurs de croissance. Cette étude montre également que l'Epo inhibe la GSK-3, permettant la survie des progéniteurs, et que cet effet passe par la voie PI3K/Akt puisqu'il est inhibé par le LY294002 (Somervaille et al., 2001).

Prolifération – cycle cellulaire

La voie PI3K/Akt a également un rôle crucial dans la prolifération et le contrôle du cycle cellulaire dans le lignage érythroïde. L'effet prolifératif induit par l'Epo sur les progéniteurs érythroïdes précoces est complètement bloqué par l'inhibiteur de la PI3K, LY294002, qui induit un arrêt du cycle en G0/G1 (Myklebust et al., 2002). Différentes études ont identifié plusieurs acteurs du cycle cellulaire comme étant PI3K-dépendants (**Illustration 15**).

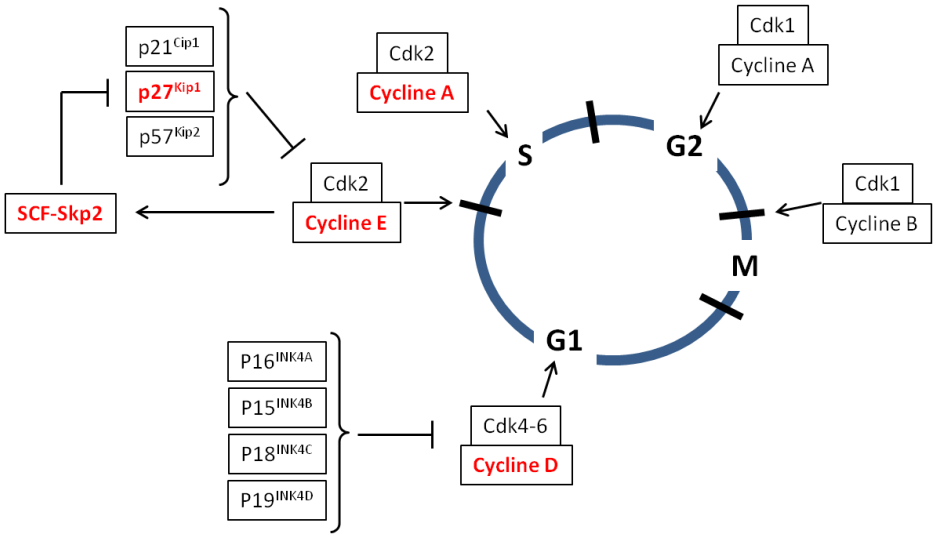


Illustration 15 : <u>Schéma simplifié du cycle cellulaire</u> (d'après Meijer, 2003)
Certains acteurs du cycle cellulaire (indiqués en rouge) ont été identifiés comme étant PI3K-dépendants dans les progéniteurs érythroïdes.

Il a été montré que la stimulation par l'Epo induit une augmentation de la quantité de cyclines D1 et D3 dans les progéniteurs érythroïdes humains, et que cet effet est médié par la PI3K puisqu'il est annulé par le LY294002 (Bouscary et al., 2003). De la même manière, une étude plus récente montre que l'Epo induit la progression du cycle cellulaire via l'augmentation de l'expression des cyclines D3, E et A dans les progéniteurs humains CD34+, de façon PI3K-dépendante (Sivertsen et al., 2006).

En réponse à l'Epo, la PI3K stimule également la prolifération des progéniteurs érythroïdes en permettant la dégradation par le protéasome de $p27^{Kip1}$ (un inhibiteur des Cyclin-Dependant-Kinase – CDK) grâce au complexe ubiquitine E3 ligase SCF-Skp2. En effet, dans ces cellules, l'Epo induit une augmentation de SCF-Skp2 et une diminution de $p27^{Kip1}$, et cet effet est annulé par le LY294002 (Bouscary et al., 2003).

Différenciation érythroïde

En plus de son rôle dans la survie et la prolifération des progéniteurs érythroïdes, plusieurs études ont montré un effet de la PI3K sur la différenciation érythroïde terminale.

En effet, une étude a montré que la présence de LY294002 (inhibiteur de la PI3K) bloquait l'apparition de la Glycophorine A (GPA), marqueur de la différenciation érythroïde terminale, à la surface des cellules CD34+ humaines cultivées en présence d'Epo et de SCF, suggérant un rôle de la PI3K dans la maturation des progéniteurs érythroïdes (Myklebust et al., 2002). De plus, l'expression d'une protéine Akt constitutivement active permet de restaurer la différenciation érythroïde de cellules de foie fœtal $JAK2^{-/-}$, ainsi que celle de cellules de foie fœtal sauvage en absence d'Epo (Ghaffari et al., 2006). Cette étude montre que l'induction de la différenciation érythroïde par Akt n'est pas seulement due à une augmentation de la prolifération puisque celle-ci n'était pas accompagnée d'une augmentation du nombre de cellules. De plus, l'inhibition de l'expression d'Akt dans ces mêmes cellules par shRNA entraîne une diminution significative de l'expression de gènes érythroïdes (*β-globin* et *Alas2*). La voie Epo/JAK2/PI3K/Akt a donc bien un effet sur la différenciation érythroïde.

D'autre part, deux études, dont une du laboratoire (Kadri et al., 2005; Zhao et al., 2006), ont montré qu'en réponse à la signalisation Epo, Akt phosphoryle directement le facteur de transcription érythroïde GATA-1 et régule sa fonction de transactivation. Ce point sera traité plus en détail dans le chapitre *2.1.4*.

1.3. Coopérations de l'Epo-R avec d'autres récepteurs

Le récepteur au Stem Cell Factor : c-Kit

L'Epo et le SCF sont tous deux nécessaires à une érythropoïèse normale. Bien que le SCF permette la croissance et la survie des progéniteurs érythroïdes, son effet est largement amplifié par la présence d'Epo. De la même manière, l'Epo seule est capable d'induire la formation de colonies érythroïdes à partir de progéniteurs *in vitro*, cependant la présence de SCF dans le milieu augmente fortement le nombre de colonies formées (McNiece et al., 1991; Muta et al., 1994). Ces éléments indiquent que l'Epo et le SCF agissent en synergie, suggérant l'existence d'une coopération entre leurs deux récepteurs Epo-R et c-Kit. Plusieurs études ont d'ailleurs montré cette coopération.

En effet, une étude effectuée dans les cellules HCD57, une lignée érythro-leucémique dépendante de l'Epo et exprimant un fort taux de c-Kit, montre que la stimulation du récepteur c-Kit par le SCF active l'Epo-R en phosphorylant les tyrosines de son domaine intracellulaire. Le SCF est d'ailleurs capable de remplacer l'Epo pour la croissance et la survie de ces cellules. Une analyse biochimique de ces cellules montre d'ailleurs qu'il existe une interaction physique entre les deux récepteurs c-Kit et Epo-R via le domaine box2 cytoplasmique de l'Epo-R. Les auteurs suggèrent que c-Kit active l'Epo-R par phosphorylation des tyrosines pour induire davantage de prolifération et de maturation des progéniteurs érythroïdes (Wu et al., 1995a). Les mêmes auteurs ont ensuite montré que des progéniteurs érythroïdes issus de foie fœtaux murins Epo-$R^{-/-}$ et infectés *in vitro* par un rétrovirus exprimant la forme sauvage de l'Epo-R, nécessitent une co-stimulation Epo + SCF pour la formation de colonies CFU-e. Une interaction entre c-Kit et Epo-R est donc nécessaire aux alentours du stade CFU-e pour la différenciation érythroïde (Wu et al., 1997). A l'inverse, il a été montré que dans la lignée UT-7/Epo, lignée érythro-mégacaryoblastique strictement dépendante de l'Epo, l'Epo induit la dimérisation et la phosphorylation sur tyrosine du récepteur c-Kit (Broudy et al., 1998). Chacun des deux récepteurs, stimulé par son ligand, est donc capable d'induire l'activation de l'autre récepteur par dimérisation et/ou phosphorylation des tyrosines. Cependant, la phosphorylation de l'Epo-R par c-Kit n'est pas suffisante pour la transduction du signal via l'Epo-R ni pour la prolifération de progéniteurs érythroïdes humains. Toutefois, le SCF et l'Epo activent de façon synergique la voie des MAP-Kinases (MAPK, ERK1/2), ce qui expliquerait l'effet synergique de ces deux facteurs sur la prolifération (Sui et al., 1998). Une étude de Tan et al. a montré l'importance de la kinase Src dans la coopération c-Kit/Epo-R. En effet, l'expression d'un récepteur c-Kit muté sur les Tyrosines 567 et 569 (sites de liaison de Src) ne permet pas la coopération avec l'Epo-R, et ceci est associé à une diminution de la phosphorylation de l'Epo-R. De plus, la restauration uniquement des sites de liaison à Src (Tyr567 et Tyr569) dans un récepteur c-Kit déficient pour tous les sites de liaison critiques à la signalisation permet de restaurer la synergie c-Kit/Epo-R (Tan et al., 2003). D'autre part, l'effet

synergique de c-Kit et Epo-R semble également passer par la PI3K puisque l'inhibiteur LY294002 supprime l'augmentation de l'érythropoïèse induite par l'action combinée du SCF et de l'Epo (Myklebust et al., 2002).

En plus des mécanismes présentés jusqu'ici, un autre mode de coopération par lequel c-Kit et Epo-R augmentent la prolifération et la survie des proérythroblastes a été décrit. Une étude de Kapur&Zhang montre que, dans les cellules G1E-ER2, une lignée de progéniteurs érythroïdes murins, le SCF permet l'augmentation de l'expression de l'Epo-R et de STAT5. Ils suggèrent que l'activation de c-Kit par le SCF est nécessaire à l'expression de l'Epo-R et de STAT5, permettant ainsi leur activation optimale par l'Epo, suivie de l'induction de Bcl-X_L et de l'augmentation de la survie de ces cellules (Kapur and Zhang, 2001). Cette théorie est également supportée par une précédente étude montrant que dans la lignée leucémique humaine HML/SE, la stimulation par le SCF induit une augmentation de l'ARNm de l'Epo-R. Les auteurs montrent que le SCF, cytokine précoce de l'hématopoïèse, induit l'expression du récepteur à l'Epo, cytokine lignage-spécifique, et permet également l'acquisition de la sensibilité à l'Epo des cellules (Sato et al., 1998). Par ailleurs, Sivertsen et al. ont montré que la signalisation Epo/PI3K/Akt induisait une augmentation de l'expression de c-Kit, au niveau ARNm et protéine, dans les progéniteurs érythroïdes précoces humains (Sivertsen et al., 2006). Les deux récepteurs c-Kit et Epo-R sont donc capables d'induire mutuellement leur expression via leurs voies de signalisation respectives.

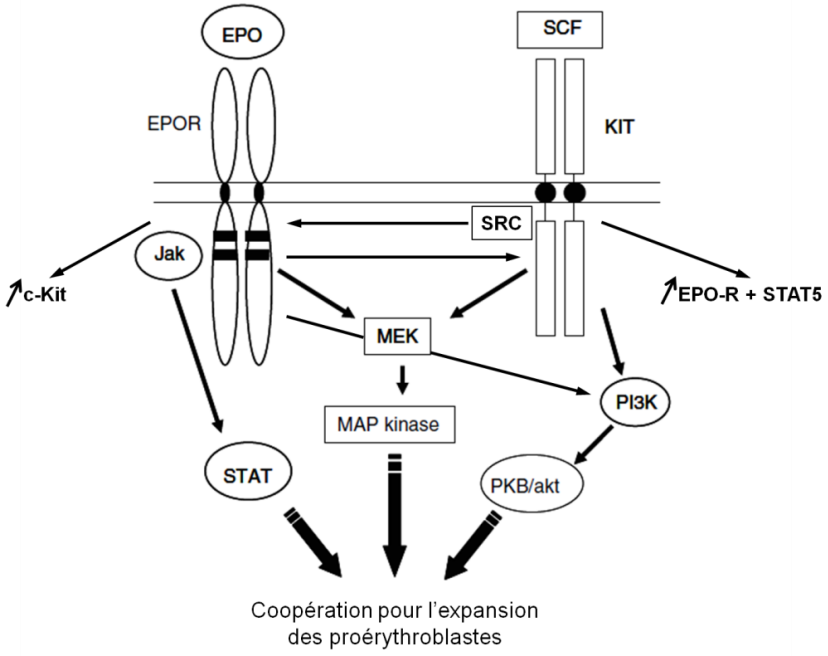


Illustration 16 : <u>Mécanismes de coopération entre c-Kit et Epo-R</u> (adapté de Arcasoy and Jiang, 2005)
Les récepteurs c-Kit et Epo-R coopèrent par différents mécanismes pour assurer la survie et la prolifération des progéniteurs érythroïdes. C-Kit et Epo-R s'activent mutuellement par phosphorylation des tyrosines et/ou dimérisation, ils agissent en synergie pour activer des voies de signalisation communes, et chaque récepteur est capable d'induire l'expression de l'autre via les voies de signalisation.

Le récepteur aux glucocorticoïdes : GR

Au cours de l'érythropoïèse, c-Kit et Epo-R coopèrent également avec un autre récepteur : le récepteur aux glucocorticoïdes (GR). Dans les progéniteurs érythroïdes humains, le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) coopère avec l'Epo-R activé et c-Kit pour induire la prolifération et retarder la différenciation (Von Lindern et al., 1999). En effet, l'addition de dexamethasone, une hormone glucocorticoïde de synthèse, au milieu contenant de l'Epo et du SCF permet le maintien à long-terme de la prolifération des progéniteurs érythroïdes humains issus de sang de cordon, de moelle ou de sang périphérique. Elle induit une amplification d'environ 10^5 à 10^6 fois des cellules érythroïdes en culture liquide. La dexamethasone coopère avec l'Epo et le SCF pour maintenir la capacité des progéniteurs à former des colonies *in vitro* tout en retardant leur différenciation (Von Lindern et al., 1999). *In vivo*, il semble que l'Epo, le SCF et les glucocorticoïdes coopèrent pour induire l'expansion des progéniteurs érythroïdes dans la rate lors de l'érythropoïèse de stress chez la souris (Bauer et al., 1999).

Le récepteur à la Transferrine de type 2 : TfR2

La transferrine est une protéine synthétisée par le foie permettant le transport du fer dans l'organisme. Chaque molécule est capable de fixer deux atomes de fer. Elle est internalisée dans les cellules après fixation sur un récepteur spécifique : le récepteur à la transferrine (TfR). Les mammifères possèdent deux récepteurs à la transferrine de structures similaires mais ayant des fonctions spécifiques. Le TfR1 (appelé aussi CD71) est exprimé dans la plupart des cellules dont les précurseurs érythroïdes. Une délétion du gène *TfR1* entraîne une anémie létale chez la souris (Levy et al., 1999). Ce phénomène n'est pas compensé par le TfR2. En effet, celui-ci n'est pas ubiquitaire. Le TfR2 est fortement exprimé dans le foie (Kawabata et al., 1999) où il joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme du fer. Il contribue à réguler la production d'hepcidine selon les besoins de l'organisme en détectant le fer circulant lié à la transferrine (Gao et al., 2009). Des mutations invalidant le gène *TfR2* sont responsables d'hémochromatose chez l'homme (Camaschella et al., 2000), et une délétion ciblée de ce gène dans le foie conduit à une surcharge en fer chez la souris (Fleming et al., 2002; Wallace et al., 2007).

Récemment, une étude a montré que le TfR2 a également une fonction non hépatique. Il fait en effet partie du complexe Epo-R et est nécessaire à l'érythropoïèse (Forejtnikovà et al., 2010). Le TfR2 et l'Epo-R sont exprimés de manière synchronisée pendant la différenciation des progéniteurs érythroïdes. Le TfR2 s'associe avec l'Epo-R dans le réticulum endoplasmique et est nécessaire pour son transport à la membrane. Les progéniteurs des souris $TfR2^{-/-}$ ont une sensibilité à l'Epo diminuée et ces souris présentent une augmentation du niveau d'Epo circulante. De plus, la diminution de

l'expression de TfR2 (TfR2 knockdown) retarde la différenciation des progéniteurs érythroïdes humains. L'interaction Epo-R/TfR2 est donc nécessaire pour une érythropoïèse efficace.

1.4. IGF-1 et érythropoïèse

Comme nous le verrons dans la troisième partie des résultats, nous avons mis en évidence au cours de ce travail une implication de l'IGF-1 dans la compensation *in vivo* d'un défaut érythroïde. J'ai donc choisi de consacrer ce paragraphe à la description de ce facteur de croissance et de son rôle dans l'érythropoïèse.

1.4.1. Généralités : l'IGF-1 et son récepteur

L'Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) est une hormone impliquée dans la croissance et la prolifération cellulaire. Elle est produite par le foie sous le contrôle de l'hormone de croissance GH (Growth Hormone). Dans la circulation, l'IGF-1 est associé aux IGFBP (IGF-Binding Protein) qui le stabilisent et le conduisent vers ses tissus cibles (Le Roith et al., 2001). Il se lie à son récepteur spécifique, l'IGF-1R, un récepteur à Tyrosine Kinase (RTK). Les invalidations géniques de l'IGF-1 et de l'IGF-1R chez la souris entraînent un important retard de croissance au cours du développement (60% et 45% de la taille normale respectivement). Les souris *igf-1r*$^{-/-}$ meurent peu après la naissance d'insuffisante respiratoire (Liu et al., 1993).

Comme son nom l'indique, l'IGF-1 partage une forte homologie avec l'Insuline, hormone impliquée dans la régulation du métabolisme glucidique. Le récepteur à l'Insuline (InsR) et l'IGF-1R sont également très similaires, non seulement dans leur structure (RTK dimériques) mais aussi dans leurs voies de signalisation. Ils sont d'ailleurs soumis à des « cross-talk ». L'Insuline est capable de se fixer à l'IGF-1R, inversement l'IGF-1 peut se lier à l'InsR, et il existe un récepteur hybride (Hybrid-R) composé d'un monomère de chaque récepteur qui peut être activé par les deux ligands.

Par ailleurs, l'IGF-1 a été directement impliqué dans le transport du glucose. Il a été montré qu'il augmente le recrutement des transporteurs de glucose GLUT3 et GLUT4 à la surface des monocytes de patients hyperthyroïdiques (Dimitriadis et al., 2008). L'IGF-1R est également impliqué, avec la voie PI3K/Akt, dans l'augmentation du transport du glucose via GLUT1 par les récepteurs opioïdes (Olianas et al., 2011).

1.4.2. Rôle de l'IGF-1 dans l'érythropoïèse

L'implication de l'IGF-1 dans l'érythropoïèse est déjà connue depuis de nombreuses années. L'IGF-1R est en effet exprimé à la surface des progéniteurs érythroïdes et des érythrocytes (Polychronakos et al., 1983; Catanese et al., 1986).

In vitro, l'IGF-1 est utilisé pour la culture des progéniteurs érythroïdes. Il a été montré qu'il est nécessaire au développement correct des CFU-e humaines (Sawada et al., 1989; Boyer et al., 1992), et qu'il stimule la prolifération des BFU-e tardives et CFU-e (Miyagawa et al., 2000). Il est d'ailleurs capable, à de fortes concentrations, de remplacer l'Epo pour la formation de BFU-e (Correa and Axelrad, 1991). L'IGF-1 agit en synergie avec l'Epo pour promouvoir la maturation au cours des derniers stades de l'érythropoïèse, en augmentant la synthèse de l'hème et en induisant la condensation nucléaire et l'énucléation (Muta et al., 1994). De plus, il est également utilisé pour la production d'érythrocytes humains *ex vivo* à visée thérapeutique (pour revue : Migliaccio et al., 2012). L'équipe de Douay notamment a mis au point des protocoles utilisant l'IGF-1 et permettant l'obtention d'érythrocytes matures *in vitro* (90-100% d'énucléation, des caractéristiques morphologiques classiques, une expression enzymatique normale et une déformabilité membranaire normale) (Douay and Andreu, 2007).

In vivo, l'IGF-1 a été impliqué dans la Polyglobulie de Vaquez (Polycythemia Vera – PV), pathologie caractérisée par une production aberrante des globules rouges. Les progéniteurs érythroïdes (BFU-e) de patients atteints de PV sont hypersensibles à l'IGF-1 : ils répondent à des doses 100 fois plus faibles que les progéniteurs de patients sains (Correa et al., 1994). La même équipe a montré que l'activation basale de l'IGF-1R est augmentée dans les cellules de patients atteints de PV (Mirza et al., 1995). Ils ont montré également que le niveau de IGFBP-1 (IGF Binding Protein-1) circulant est élevé chez les patients atteins de PV, et que cette protéine stimule la formation de BFU-e *in vitro* (Mirza et al., 1997). Chez des sujets sains, le taux plasmatique d'IGF-1 est corrélé à la concentration sanguine d'hémoglobine, indépendamment du taux plasmatique d'Epo (Anttila et al., 1994; Nilsson-Ehle et al., 2005). Un faible taux d'IGF-1 plasmatique a d'ailleurs été associé récemment à des anémies (Succurro et al., 2011).

2. Le facteur de transcription GATA-1 et ses cofacteurs

2.1. Le facteur de transcription GATA-1

2.1.1. Famille, structure, expression

La famille de facteurs de transcription GATA est composée de 6 membres : GATA-1 à GATA-6. Ces protéines sont capables de lier avec une grande affinité une séquence d'ADN consensus : 5' (A/T) GATA (A/G) 3'. Elles contiennent deux domaines en doigt de zinc fortement conservés du type Cys-X_2-Cys-X_{17}-Cys-X_2-Cys. GATA-1, GATA-2 et GATA-3 sont exprimés principalement dans le tissu hématopoïétique (Weiss and Orkin, 1995), tandis que GATA-4, GATA-5 et GATA-6 sont exprimés dans les tissus d'origine mésodermique et endodermique tels que le cœur, le foie, le poumon, l'intestin et les gonades (Molkentin, 2000).

GATA-1, précédemment nommé NF-E1, NF-1, Ery-1 et GF-1, est le membre fondateur de la famille de facteurs de transcription GATA. Il a été identifié en 1988 pour sa liaison spécifique à l'enhancer 3' du gène de la β-globine humaine (Wall et al., 1988), ainsi qu'aux séquences régulatrices des gènes de globines du poulet (Evans et al., 1988). Le gène de GATA-1 a été cloné pour la première fois en 1989 à partir d'une lignée murine (Tsai et al., 1989). Chez l'homme, comme chez la souris, il est situé sur le chromosome X (Zon et al., 1990; Chapman et al., 1991) et code pour une protéine de 413 acides aminés. Il existe en réalité deux isoformes de GATA-1 : la forme longue GATA-1 de 47kDa, et la forme courte GATA-1s (GATA-1short) de 40 kDa. Ces deux protéines sont produites à partir d'un même transcrit : un deuxième site d'initiation situé en position 84 produit la forme courte (Calligaris et al., 1995). Chez l'homme, la forme courte est également produite grâce à un épissage alternatif qui supprime l'exon 2 produisant ainsi deux transcrits différents (Rainis et al., 2003) (**Illustration 17**). Ce transcrit alternatif n'est pas retrouvé chez la souris (Halsey et al., 2010).

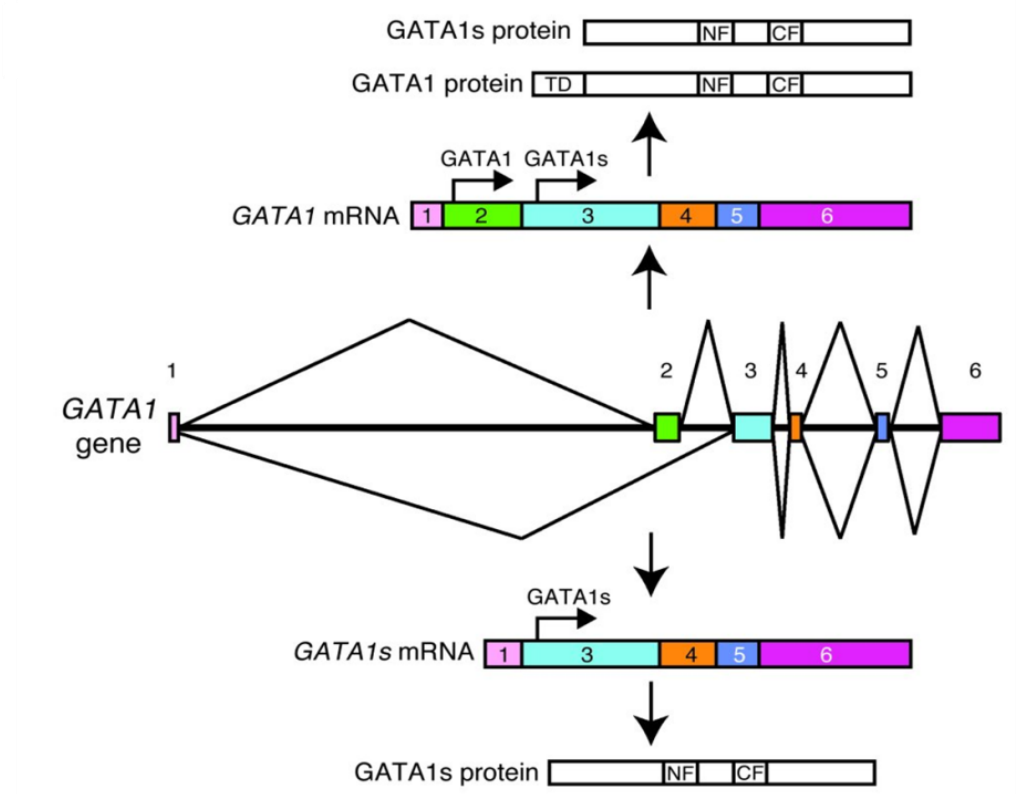


Illustration 17 : <u>Epissage alternatif du gène gata-1 humain</u> (Sankaran et al., 2012)
Le gène gata-1 compte six exons. L'ARNm contenant les six exons possède deux site d'initiation de la traduction et donne lieu à la production de deux protéines : GATA-1 (47kDa) et GATA-1s (short – 40kDa). Chez l'homme, il existe un épissage alternatif qui supprime l'exon 2 et ainsi le premier site d'initiation de la traduction. L'ARNm correspondant ne produit alors que la forme courte GATA-1s.

GATA-1 est exprimé dans les cellules érythroïdes primitives et définitives (Fujiwara et al., 1996), les mastocytes (Martin et al., 1990), les mégacaryocytes (Martin et al., 1990; Romeo et al., 1990), les éosinophiles (Zon et al., 1993), les cellules dendritiques (Gutiérrez et al., 2007) ainsi que dans les cellules de Sertoli du testicule (Ito et al., 1993; Yomogida et al., 1994).

Le gène *gata-1* contient un domaine régulateur de 8,5kb situé en amont de la partie codante, nommé G1HRD (Gata-1 Hematopoietic Regulatory Domain) (Suzuki et al., 2011). Ce domaine contient quatre éléments régulateurs distincts : un enhancer G1HE (Gata-1 Hematopoietic Enhancer), un double motif GATA, un motif CACCC et une région de 320 pb du premier intron (Ohneda et al., 2002), permettant l'expression de GATA-1 à un niveau suffisant pour supprimer la létalité embryonnaire de souris GATA-1.05 (Takahashi et al., 2000). Il n'est cependant pas suffisant pour permettre l'expression complète de GATA-1 au stade BFU-e (Onodera et al., 1997). Une autre région régulatrice a d'ailleurs été identifiée récemment en dehors du G1HRD, qui serait nécessaire à l'expression de GATA-1 (Drissen et al., 2010).

L'expression de GATA-1 est régulée par différents facteurs de transcription. On trouve en effet, dans le domaine régulateur, des sites de liaison de facteurs ubiquitaires comme CP2 ou Smad5

(Kaneko et al., 2010), ainsi que plusieurs motifs GATA permettant l'activation de la transcription du gène *gata-1* par les protéines GATA-1 et GATA-2 (Ohneda and Yamamoto, 2002).

La protéine GATA-1 possède trois domaines fonctionnels connus : un domaine d'activation N-terminal constitué des acides aminés 1 à 83, le doigt de zinc N-terminal (AA 204-228), et le doigt de zinc C-terminal (AA 258-282) (**Illustration 18**). Les fonctions de ces différents domaines seront détaillées dans le paragraphe *2.1.2.b*.

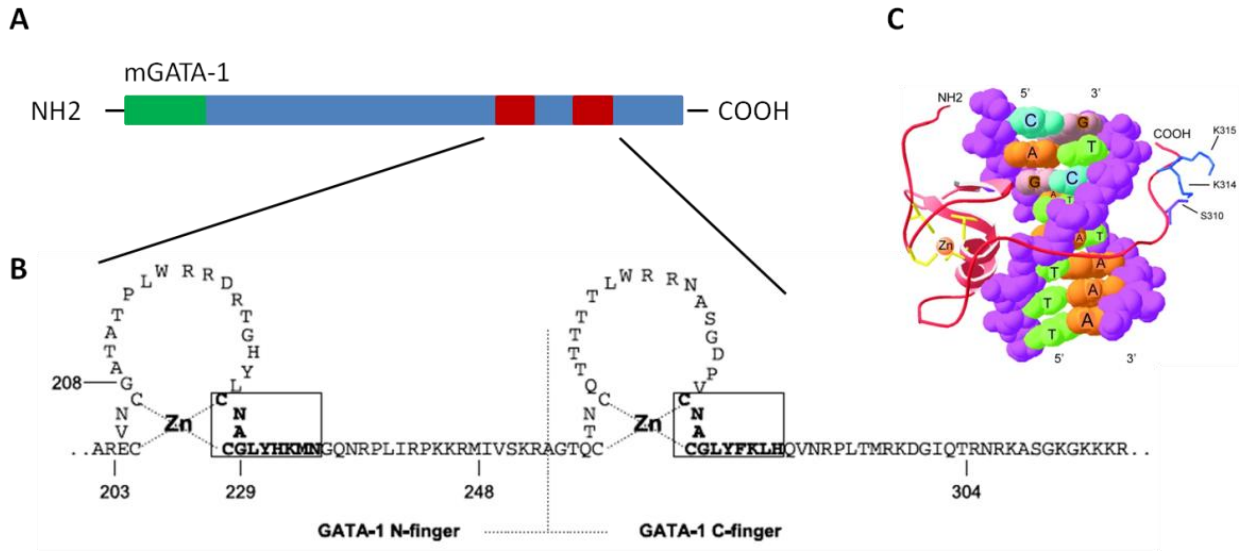


Illustration 18 : <u>Structure de GATA-1</u>
A. GATA-1 possède trois domaines fonctionnels : un domaine d'activation N-terminal (vert) (AA 1-83), et deux doigts de zinc (rouge) : un N-terminal (AA 204-228) et un C-terminal (AA 258-282). **B.** La séquence peptidique des doigts de zinc est détaillée (Imanishi et al., 2010). **C.** Structure tridimensionnelle du doigt de zinc C-terminal de la protéine GATA-1 de poulet liée à la double hélice d'ADN (Ferreira et al., 2005).

2.1.2. Rôle physiologique de GATA-1

GATA-1 est un facteur de transcription majeur de l'hématopoïèse. Il a en effet un rôle important dans le développement de plusieurs types cellulaires hématopoïétiques comme les mastocytes, les éosinophiles, les plaquettes et les érythrocytes (**Illustration 19**).

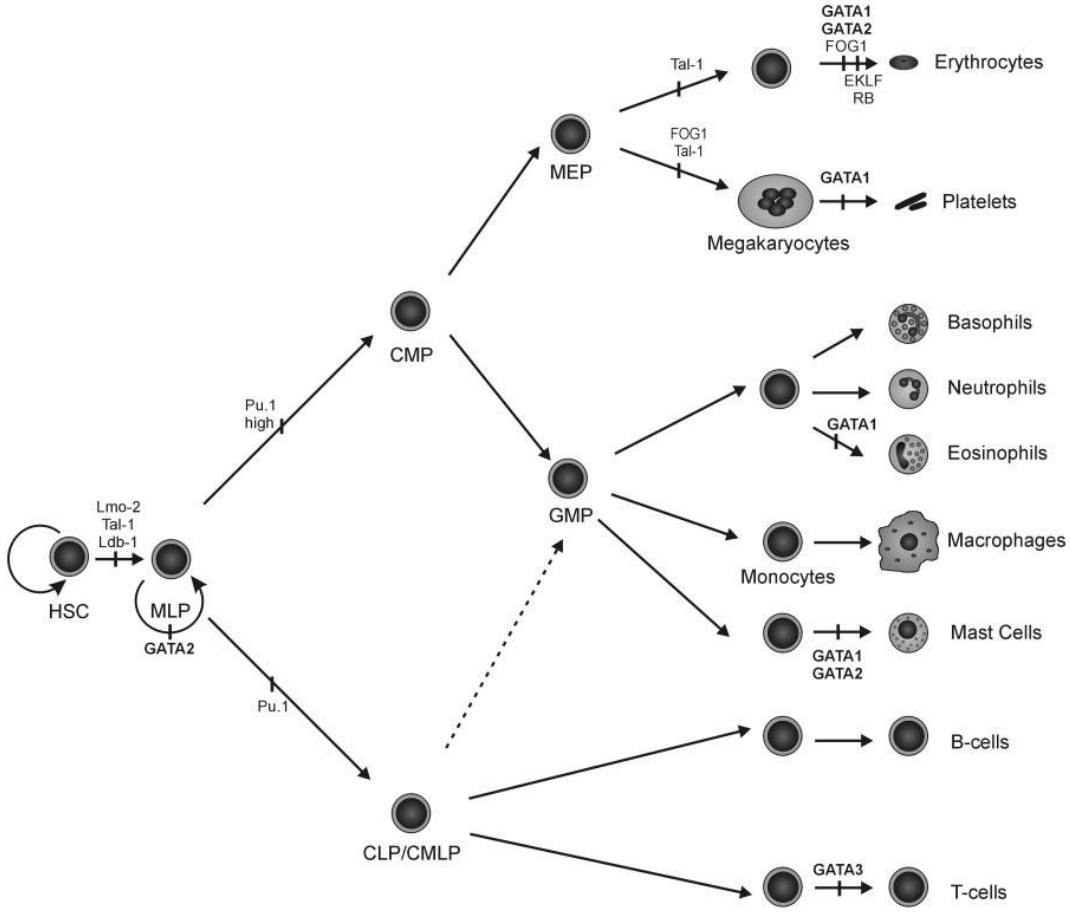


Illustration 19 : Impact de GATA-1 et ses partenaires sur les différents lignages hématopoïétiques (Ferreira et al., 2005)
Le facteur de transcription GATA-1 est impliqué dans le développement de plusieurs types cellulaires hématopoïétiques : les érythrocytes, les plaquettes, les éosinophiles et les mastocytes. Les points d'impact de certains partenaires de GATA-1 importants pour l'hématopoïèse sont également indiqués.

Nous nous intéresserons plus particulièrement à son rôle dans l'érythropoïèse.

2.1.2.a. Invalidations géniques et modèles d'études

In vitro

Des cellules souches embryonnaires (cellules ES) invalidées pour le gène *gata-1* participent aux tissus non-hématopoïétiques, ainsi qu'à la fraction leucocytaire, mais ne contribuent pas à la population érythroïde mature de souris chimères (Pevny et al., 1991). Des études de différenciation

in vitro montrent que ces cellules ES *gata-1*$^{-}$ sont incapables de produire des progéniteurs érythroïdes primitifs. Elles produisent, en revanche, des progéniteurs érythroïdes définitifs normaux, mais ces derniers subissent un arrêt de développement et meurent au stade proérythroblaste (Weiss et al., 1994; Pevny et al., 1995). La mort cellulaire de ces progéniteurs *gata-1*$^{-}$ présente des caractéristiques d'apoptose. GATA-1, en plus de son rôle dans la régulation des gènes conférant le phénotype érythroïde, semble donc également permettre la survie des précurseurs érythroïdes en inhibant l'apoptose (Weiss and Orkin, 1995b).

En souhaitant déterminer si l'arrêt de développement et l'apoptose des progéniteurs érythroïdes issus des cellules ES *gata-1*$^{-}$ pouvaient être découplés, les auteurs de ces études ont créé une lignée cellulaire *gata-1*$^{-}$: la lignée G1E (GATA-1^{-} Erythroid) (Weiss et al., 1997). Afin de retarder l'apoptose des progéniteurs érythroïdes, ils ont exprimés de manière stable le gène anti-apoptotique humain *bcl-2* dans les cellules ES *gata-1*$^{-}$. Après différenciation *in vitro*, un clone a produit des colonies érythroïdes présentant une survie prolongée. Ces colonies ont alors donné naissance à la lignée cellulaire G1E. Les cellules G1E présentent des caractéristiques similaires aux progéniteurs primaires *gata-1*$^{-}$, mais ne subissent pas d'apoptose et se divisent continuellement en culture. En outre, l'expression exogène de GATA-1 dans ces cellules leur permet de reprendre leur maturation érythroïde. La lignée G1E constitue ainsi un modèle de choix pour l'étude de la différenciation érythroïde terminale.

In vivo

Des souris invalidées pour le gène *gata-1* (**Knock-Out**) meurent entre 10.5 et 11.5 jours de développement embryonnaire (E10.5-E11.5) d'une anémie sévère. A E9.5, les cellules érythroïdes du sac vitellin présentent un arrêt de maturation au stade proérythroblaste (Fujiwara et al., 1996). GATA-1 joue donc un rôle essentiel dans l'érythropoïèse primitive. Des souris mutées sur le promoteur de GATA-1 et n'exprimant que 5% de la quantité de GATA-1 présente dans les souris contrôles (mutation **GATA-1.05**) meurent à E12.5 d'anémie sévère et présentent un arrêt de la différenciation érythroïde primitive (Takahashi et al., 1997). Dans les deux cas, les femelles hétérozygotes présentent une anémie plus ou moins sévère à la naissance qui disparaît par la suite. La variété des phénotypes s'explique par le chimérisme propre à chaque femelle du à l'inactivation de l'X. La sélection des progéniteurs exprimant l'allèle sauvage peut sans doute expliquer la disparition de l'anémie à l'âge adulte. La létalité des souris GATA-1.05 peut être supprimée par l'expression d'un transgène codant pour la protéine sauvage GATA-1 sous contrôle du promoteur G1HRD (Takahashi et al., 2000). Depuis, comme nous le verrons plus loin, ce modèle (souris GATA-1.05) a été utilisé dans plusieurs études pour créer de nouveaux modèles transgéniques afin d'évaluer la capacité de différentes formes mutées de GATA-1 à restaurer la viabilité de ces souris.

D'autres souris mutées également sur le promoteur de GATA-1 (mutation **Knock-Down**), exprimant 20% du niveau d'expression de la protéine sauvage, présentent un phénotype plus léger. La majorité de ces individus meurent au cours du développement embryonnaire ou après la naissance à cause d'une érythropoïèse inefficace, mais certains survivent jusqu'à l'âge adulte (McDevitt et al., 1997).

Ces différents modèles *in vitro* et *in vivo* montrent le rôle essentiel de GATA-1 dans l'érythropoïèse primitive et définitive, et établissent un lien direct entre le niveau d'expression de GATA-1 et l'efficacité de l'érythropoïèse. La lignée G1E *in vitro* et le modèle murin GATA-1.05 *in vivo* sont deux modèles permettant l'étude du rôle de GATA-1 et de ses domaines fonctionnels.

2.1.2.b. Importance physiologique des domaines fonctionnels

Les doigts de zinc

Les doigts de zinc N-terminal et C-terminal sont tous deux essentiels à l'érythropoïèse. En effet, Shimizu et coll. ont montré que des formes de GATA-1 délétées au niveau des doigts de zinc étaient incapables de restaurer le phénotype létal des souris GATA-1.05 (Shimizu et al., 2001). Le doigt de zinc C-terminal est directement responsable de l'interaction avec l'ADN, tandis que le doigt de zinc N-terminal est nécessaire à la spécificité et la stabilité de cette interaction (Martin and Orkin, 1990). Par ailleurs, le doigt de zinc N-ter est également impliqué dans l'interaction de GATA-1 avec ses cofacteurs, soit seul comme c'est le cas avec FOG-1 (Fox et al., 1998), soit en coopération avec le doigt de zinc C-ter comme avec Sp1, EKLF ou GATA-1 lui-même (Merika and Orkin, 1995; Gregory et al., 1996; Mackay et al., 1998).

Le domaine N-terminal

Le domaine N-terminal (AA 1-83) a une fonction transactivatrice. Ce domaine est en effet indispensable pour l'activité transactivatrice de GATA-1 dans des modèles cellulaires non hématopoïétiques comme les NIH-3T3, les COS ou les HeLa (Martin and Orkin, 1990). Cependant, l'expression d'une protéine GATA-1 délétée des AA1-63 (GATA-1 Δ63) dans la lignée G1E a la même capacité que la protéine sauvage à induire la maturation érythroïde des cellules. Le domaine N-terminal de GATA-1 ne semble donc pas nécessaire à l'érythropoïèse terminale *in vitro* (Weiss et al., 1997). *In vivo*, l'expression d'un transgène codant pour la protéine GATA-1 délétée des AA1-83 à un niveau comparable à la protéine endogène ne permet pas d'assurer l'érythropoïèse des souris GATA-1.05. Par contre, la surexpression de ce même transgène permet d'assurer pleinement l'érythropoïèse primitive et définitive de ces souris. La fonction du domaine N-terminal de GATA-1

peut donc être compensée par un ou plusieurs autre(s) domaine(s) si la protéine est surexprimée, mais il semble tout de même important pour l'érythropoïèse *in vivo* en condition d'expression endogène (Shimizu et al., 2001). La contradiction observée entre les études *in vitro* dans les G1E et l'étude *in vivo* pourrait s'expliquer par la différence de 20AA entre les deux domaines délétés.

Une mutation de GATA-1 dans le domaine N-terminal, conduisant à l'expression de la forme courte GATA-1s, a été identifiée chez une famille de patients anémiques présentant des défauts d'érythropoïèse (Hollanda et al., 2006). Récemment, deux mutations similaires induisant également l'expression de GATA-1s ont été identifiées chez des patients atteints d'anémie de Diamond-Blackfan (DBA) (Sankaran et al., 2012a). A l'inverse, d'autres mutations du même type sont associées au syndrome myéloprolifératif transitoire (TMD – Transient Myeloproliferative Disorder) et à la leucémie mégacaryoblastique aiguë (AMKL – Acute MegaKaryoblastic Leukemia) survenant chez les patients atteints du syndrome de Down (DS) (trisomie 21) (Wechsler et al., 2002; Greene et al., 2003). Par ailleurs, des études *in vitro* et *in vivo* montrent que la forme courte GATA-1s induit l'hyperprolifération de progéniteurs mégacaryocytaires murins (Li et al., 2005; Muntean and Crispino, 2005).

Ces différents éléments semblent indiquer l'importance du domaine N-terminal de GATA-1, mais son rôle précis reste encore à définir.

Un nouveau domaine C-terminal

Récemment, l'équipe de R. Shimizu a défini, par complémentation transgénique des souris GATA-1.05, un nouveau domaine transactivateur dans la région C-terminale de GATA-1 (Kaneko et al., 2012). Ce second domaine de transactivation partage des activités redondantes avec le domaine N-ter mais aurait également des activités spécifiques nécessaires à l'hématopoïèse *in vivo*.

2.1.3. Rôle moléculaire de GATA-1 – fonction transcriptionnelle

Au cours de l'érythropoïèse, GATA-1 active les gènes nécessaires à la mise en place du phénotype érythroïde et réprime des gènes hématopoïétiques spécifiques d'autres lignages.

Ainsi, il active l'expression des gènes de globines, *α-globin* et *β-globin*, (Wall et al., 1988; Martin and Orkin, 1990), ainsi que des gènes codant pour des enzymes de la synthèse de l'hème telles que la 5-Aminolévulinate Synthase 2 (*Alas2*) (Kramer et al., 2000) ou la Porphobilinogène Désaminase (PBG-D) (Chretien et al., 1988; Eleouet and Roméo, 1993). Il contrôle également les gènes codant pour les protéines de la membrane érythrocytaire comme l'α-spectrine (*Spta1*), la protéine 4.9 (*Epb4.9*), Band3 (*Slc4a1*) ou l'aquaporine (*Aqp1*). Plusieurs études ont en effet montré l'occupation par GATA-1 de différents loci de gènes de membrane (Boulanger et al., 2002; Steiner et al., 2009; Hasegawa et

al., 2012). Il a été montré que GATA-1 régule positivement le gène du récepteur à l'Epo (Zon et al., 1991). Par la suite, une autre étude a montré que GATA-1 transactive l'Epo-R à un stade précoce de la différenciation, et que le signal médié par l'Epo induisait une augmentation de l'expression de GATA-1, permettant ainsi son amplification (Chiba et al., 1991). Il régule également d'autres facteurs de transcription comme l'Erythroid Krüppel-Like Factor (EKLF) (Crossley et al., 1994), et induit aussi l'expression de son cofacteur FOG-1 rapidement au cours de la différenciation (Welch et al., 2004).

A l'inverse, GATA-1 réprime des gènes de l'hématopoïèse précoce ou spécifiques d'autres lignages. Ainsi, il régule négativement GATA-2 (Grass et al., 2003), c-Kit (Munugalavadla et al., 2005), ainsi que les gènes hématopoïétiques *Lyl1*, *Rgs1*, *Rgs18*, *Treml2* ou *Clec4d* (Welch et al., 2004; Johnson et al., 2007).

Mis à part son rôle de facteur érythroïde, GATA-1 semble également avoir un rôle de facteur de survie, en coopération avec l'Epo. Une étude a montré que l'expression de GATA-1 dans la lignée G1E induit une forte augmentation de l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-X_L, et que cette augmentation nécessite également l'érythropoïétine (Gregory et al., 1999). GATA-1 semble également induire l'expression du transporteur mitochondrial ABC-me (Shirihai et al., 2000). Le rôle de ce transporteur n'est pas encore bien défini mais il semble avoir un rôle essentiel dans l'érythropoïèse puisque des souris ABC-me$^{-/-}$ meurent à E12.5 d'anémie sévère (Hyde et al., 2012).

Par ailleurs, plusieurs éléments suggèrent depuis longtemps une implication de GATA-1 dans la régulation du cycle cellulaire au cours de la différenciation érythroïde. En effet, l'expression ectopique de GATA-1 dans une lignée de fibroblastes (NIH-3T3) ou une lignée hématopoïétique (FDCP-1) conduit à une diminution de la prolifération (Dubart et al., 1996). De plus, des mutations de GATA-1 sont associées chez des patients à des syndromes myéloprolifératifs ou des leucémies (Wechsler et al., 2002; Xu et al., 2003).

Depuis, plusieurs études ont apporté des éléments nouveaux corroborant cette hypothèse. Au cours de la différenciation érythroïde, la présence de GATA-1 induit l'expression de gènes anti-prolifératifs comme les inhibiteurs de Cdk p18^{INK4C} et p27^{Kip1}, et réprime des gènes prolifératifs comme la Cdk6 et la cycline D2. Cependant, il semble que ces gènes soient des cibles indirectes de GATA-1, car ces effets sont dépendants de la répression de l'oncogène *Myc*. Celle-ci semble en revanche induite directement par GATA-1 puisque des études d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) montrent que GATA-1 est associé au promoteur de *Myc in vivo* (Rylski et al., 2003). L'oncogène *c-Myb* semble également directement réprimé par GATA-1 qui se fixe sur les sites GATA de son promoteur (Bartůnek et al., 2003). Une autre équipe a montré par des études de gène rapporteur et de ChIP, dans la lignée MEL (Murine ErythroLeukemia) et dans des progéniteurs

érythroïdes, que GATA-1 stimule la transcription de l'inhibiteur de Cdk p21 en se fixant en amont de son promoteur (Papetti et al., 2010). Plus récemment, il a été montré par le même type d'expériences que GATA-1 stimule l'expression du gène *cdc6*, régulateur de la phase S, ajoutant un élément supplémentaire au rôle de GATA-1 dans la régulation du cycle cellulaire (Fernández-Morales et al., 2012).

Les fonctions transcriptionnelles de GATA-1 sont donc multiples au cours de la différenciation érythroïde terminale. Si son rôle de transactivateur des gènes érythroïdes est aujourd'hui bien établi, il semble clair que sa fonction s'étend également à d'autres processus cellulaires, et en particulier à la régulation du cycle cellulaire. Un certain nombre d'éléments soutiennent déjà cette hypothèse, mais tous les mécanismes impliqués dans la fonction antiprolifératives de GATA-1 ne sont pas encore élucidés.

2.1.4. Régulation de l'activité de GATA-1 par des modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles établissent des changements moléculaires versatiles qui contrôlent des processus cellulaires fondamentaux. L'activité des facteurs de transcription peut en effet être modulée par ces modifications post-traductionnelles affectant leur activité, leur stabilité, leur localisation ou leurs interactions avec d'autres protéines. Il existe de nombreux types de modifications post-traductionnelles.

L'activité de GATA-1 est régulée par des modifications telles que l'acétylation, la sumoylation et la phosphorylation.

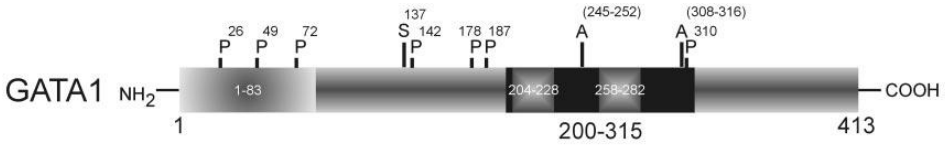


Illustration 20 : Sites de modifications post-traductionnelles de GATA-1 (Ferreira et al., 2005)
L'activité de GATA-1 est régulée par différentes modifications post-traductionnelles. GATA-1 possède deux sites d'acétylation (A) (motifs riches en Lysine AA245-252 et AA308-316), un site de sumoylation (S) (Lys137) et sept sites de phosphorylation (P) (Ser26, Ser49, Ser72, Ser142, Ser178, Ser187 et Ser310).

Acétylation

GATA-1 peut être acétylé *in vitro* et *in vivo* par les acétyltransférases P300 (Boyes et al., 1998) et CBP (CREB-binding protein) (Hung et al., 1999) ubiquitaires. Chez la souris, GATA-1 est acétylé sur

deux motifs riches en Lysine (AA245-252 et AA308-316) localisés du coté C-terminal de chaque doigt de zinc. Ces motifs sont conservés parmi les membres de la famille GATA et entre les espèces.

L'importance fonctionnelle de l'acétylation de GATA-1 n'est pas encore bien définie. En effet, l'interaction entre GATA-1 et P300/CBP donc l'acétylation de GATA-1 semble stimuler son activité transcriptionnelle en augmentant sa liaison à l'ADN chez le poulet (Boyes et al., 1998). Mais cet effet n'a pas tout d'abord pas été observé dans des cellules murines non érythroïdes (Hung et al., 1999). Par contre, l'acétylation de GATA-1 semblait tout de même être nécessaire pour la différenciation érythroïde puisque des mutations des sites d'acétylation bloquent la différenciation de la lignée G1E (Hung et al., 1999). Récemment, il a finalement été montré, dans la lignée G1E, que l'acétylation de GATA-1 semble nécessaire à sa liaison à l'ADN (Lamonica et al., 2006).

Sumoylation

La sumoylation est une modification post-traductionnelle réversible qui a été montrée comme régulant d'importants facteurs de transcription impliqués dans la prolifération, la différenciation et la suppression de tumeur. Elle consiste à fixer une petite protéine SUMO (Small Ubiquitin-like protein Modifier). Il existe à ce jour quatre protéines SUMO connues chez les mammifères, SUMO-1 à 4. La sumoylation régule divers processus cellulaires en contrôlant principalement la localisation intra-cellulaire et les interactions protéines-protéines (pour revue : Zhao, 2007).

Il a été montré que GATA-1 est sumoylé *in vitro* et *in vivo* sur un unique résidu : la Lysine 137 (Collavin et al., 2004). Dans les 293T, la protéine SUMO-ligase PIASy induit cette sumoylation. Cependant, cette étude montre qu'un mutant non sumoylable (GATA-1^{K137R}) est indiscernable de la protéine GATA-1 sauvage dans sa capacité à transactiver un gène rapporteur dans des cellules de mammifère. Une autre étude indique que la sumoylation de GATA-1 sur la Lysine 137 favorise l'activation transcriptionnelle des cibles de GATA-1 mais uniquement celles nécessitant le corégulateur FOG-1 (Lee et al., 2009). En effet, la mutation GATA-1^{K137R} dérégule l'occupation de la chromatine de GATA-1 sur certains sites et l'expression de gènes FOG-1-dépendants. L'ajout d'un groupement SUMO-1 sur cette protéine mutée inhibe les effets de la mutation. La sumoylation sur la Lys137 semble donc une modification moléculaire cruciale pour contrôler la fonction de GATA-1 sur une importante partie de ses gènes cibles. Il est intéressant de noter que la mutation V205G, inhibant l'interaction avec FOG-1, conduit au même phénotype que la mutation K137R, et que ses effets sont également inhibés par l'ajout d'un groupement SUMO-1 sur la protéine GATA-1^{V205G} (cf paragraphe *2.2.1.b*).

Plus récemment, il a été montré que la délétion de SENP1, une protéase qui désumoyle les protéines, cause une anémie létale chez la souris entre E13.5 et un jour après la naissance (Yu et al., 2010). L'activité de GATA-1 et de ses gènes cibles est fortement réduite dans le foie fœtal de souris

Knock-Out pour SENP1, résultat de l'accumulation de protéines GATA-1 sumoylées. Les études mécanistiques suggèrent que SENP1 désumoyle directement GATA-1, régulant ainsi sa liaison à l'ADN, l'expression GATA-1-dépendante de l'Epo-R et l'érythropoïèse.

Les études précédentes indiquaient que la sumoylation de GATA-1 était nécessaire à son activité transcriptionnelle. Il semble à présent que sa désumoylation le soit tout autant. Ces éléments semblent contradictoires, mais on peut penser qu'un équilibre sumoylation/désumoylation est nécessaire à l'activité de GATA-1 : une absence de sumoylation est délétère, mais un excès de protéines sumoylées l'est également.

Phosphorylation

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle capable de produire des modulations rapides de l'activité protéique en réponse à des changements de l'activité métabolique, des conditions environnementales ou des signaux hormonaux. De nombreux facteurs de transcription voient leur activité modulée par phosphorylation *in vivo*. L'effet de cette modification est variable en fonction des facteurs, incluant des changements de localisation cellulaire, de liaison à l'ADN ou de capacité à interagir avec leurs partenaires (pour revues : Hunter and Karin, 1992; Jackson, 1992; Whitmarsh and Davis, 2000).

Crossley et Orkin ont montré que GATA-1 est phosphorylée sur 6 résidus Sérine dans la partie N-terminale (Ser26, 49, 72, 142, 178 et 187) dans des cellules érythro-leucémiques murines (MEL – Murin Erythroleukemia cells) et qu'une septième Sérine, la Sérine 310, devient phosphorylée après induction de la différenciation des MEL par le DMSO (Dyméthyl Sulfoxide). L'effet de chaque phosphorylation a été testé en mutant chaque Sérine individuellement ou toutes les Sérines simultanément en Alanine pour empêcher la phosphorylation. Puis, des mutations de la Sérine 310 en Glutamate ou Aspartate ont été créées pour introduire un résidu chargé négativement, analogue à une Sérine phosphorylée. Ce site est situé près de la partie C-terminale du domaine de liaison à l'ADN dans une région conservée de la protéine supposée être impliquée dans le repliement de l'ADN. De façon surprenante, les résultats de cette étude montrent que la phosphorylation de la Sérine 310 ou des 6 autres Sérines ne modifie pas significativement l'affinité ni la spécificité de GATA-1 pour l'ADN, ni le repliement de l'ADN, ni l'activité transcriptionnelle de GATA-1 (Crossley and Orkin, 1994). Cependant, plusieurs études ont montré que la liaison à l'ADN de GATA-1 est sensible au traitement à la phosphatase alkaline, notamment dans la lignée érythro-leucémique humaine K562, suggérant un rôle de la phosphorylation de GATA-1 dans son affinité à l'ADN (Taxman et al., 1994; Partington and Patient, 1999).

Depuis, plusieurs études ont tenté de définir le rôle de la phosphorylation de GATA-1 sur les différents résidus. L'une d'entre elles a montré que, dans les cellules Ba/F3, une lignée

hématopoïétique dépendante de l'IL-3, GATA-1 est phosphorylée sur la Ser26 par la voie des MAPK en réponse à l'IL-3. Cette phosphorylation est importante pour la transactivation du gène *E4bp4* par GATA-1, l'expression de Bcl-X_L et la survie cellulaire (Yu et al., 2005). Une autre étude a montré que GATA-1 est phosphorylée par les MAPK en réponse à l'EGF sur les Ser26 et 178 dans les cellules COS et que ces phosphorylations sont importantes pour l'interaction de GATA-1 avec LMO2 (Towatari et al., 2004).

Enfin, deux études, dont une du laboratoire, ont montré que GATA-1 est phosphorylée sur la Ser310 par la kinase Akt en réponse à la signalisation induite par l'Epo, et que cette phosphorylation semble importante pour la différenciation érythroïde (Kadri et al., 2005; Zhao et al., 2006). La première étude montre que dans les cellules érythroïdes, cette phosphorylation spécifique est nécessaire à l'activation transcriptionnelle du promoteur de TIMP-1 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase), induit au cours de la différenciation érythroïde, par GATA-1 (Kadri et al., 2005). Ce mécanisme peut être reproduit dans des cellules non érythroïdes par transfection des différents partenaires moléculaires impliqués, conduisant à l'expression du gène TIMP-1 endogène habituellement silencieux. De plus, la sécrétion de TIMP-1 est fortement réduite dans les cellules érythroïdes de foie fœtal de souris Knock-In homozygotes pour le gène *gata-1^{S310A}* codant un mutant de GATA-1 non phosphorylable sur la Ser310. De plus, l'expression de ce mutant dans la lignée G1E induit une diminution de la transcription des gènes *β-major* et *Alas2* par rapport à la protéine sauvage (Zhao et al., 2006). La phosphorylation sur la Ser310 semble donc être importante pour l'activité transcriptionnelle de GATA-1. Cependant, les promoteurs érythroïdes de la glycophorine B et de Gfi-1b ne sont pas dépendants de la phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310. La phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 n'est donc pas essentielle à l'expression de tous les gènes érythroïdes mais cible une voie qui régule une partie de ces gènes (Kadri et al., 2005). Par ailleurs, l'expression de GATA-1^{S310A} dans la lignée G1E diminue le taux d'hémoglobinisation de plus de 50% comparé à la protéine GATA-1 sauvage (Kadri et al., 2005). La mutation de la Ser310 bloque également la différenciation érythroïde des progéniteurs de foie fœtal murin (Zhao et al., 2006). La phosphorylation sur la Ser310 semble donc être importante pour la différenciation érythroïde *in vitro*. Cependant, dans les deux cas, le blocage n'est que partiel et la présence de cellules benzidine-positives en présence de GATA-1^{S310A} montre que la phosphorylation a un effet quantitatif plus que qualitatif sur la différenciation érythroïde terminale. Elle est sans doute nécessaire pour une régulation fine de la production ou la fonction des cellules érythroïdes. Au niveau moléculaire, la phosphorylation de GATA-1 ne semble pas avoir d'effet sur la stabilité, l'affinité à l'ADN, ou le niveau d'acétylation des Lys proches de la Ser310.

Ces deux études montrent que la phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 semble être importante pour la différenciation érythroïde, mais son rôle moléculaire et la manière dont elle influe sur la différenciation restent encore à définir.

Les deux études *in vitro* mentionnées ci-dessus montrent que la phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 par Akt semble avoir un rôle dans la différenciation érythroïde. Cependant, il semble que cette phosphorylation ne soit pas indispensable *in vivo*. En effet, des souris présentant des mutations de substitutions remplaçant les résidus Sérine, sites de phosphorylation, par des Alanines en position 72, 142 et 310, ou uniquement en position 310 ont été créées (Rooke and Orkin, 2006). Ces souris sont viables et ne présentent aucun phénotype visible. Les paramètres sanguins, ainsi que leur réponse à un stress érythropoïétique induit par la phénylhydrazine, sont normaux. L'analyse des populations de progéniteurs hématopoïétiques au cours du développement et chez l'adulte montre une légère diminution du nombre de BFU-e et CFU-e uniquement dans la moelle osseuse adulte des triples mutants. Mais l'érythropoïèse terminale n'est pas perturbée. Cela suggère que toute conséquence associée à l'absence de phosphorylation des résidus Ser72, 142 et 310 peut être compensée dans l'environnement *in vivo*. Les mécanismes assurant cette compensation *in vivo* ne sont pas encore connus.

2.2. GATA-1 et ses cofacteurs

GATA-1 interagit avec de nombreux partenaires, que ce soit des cofacteurs ou d'autres facteurs de transcription (**Illustration 21**) (pour revues : Cantor and Orkin, 2002; Ferreira et al., 2005). Ces interactions jouent un rôle important dans l'hématopoïèse car l'activité transcriptionnelle de GATA-1 varie en fonction de ses partenaires. Différents gènes cibles de GATA-1 sont liés *in vivo* à différents complexes protéiques, associant ainsi des partenaires spécifiques de GATA-1 à différents aspects de sa fonction (Rodriguez et al., 2005).

Le principal partenaire de GATA-1 est son cofacteur FOG-1 (Friend Of GATA-1). FOG-1 joue un rôle crucial dans le développement puisque son absence entraîne une létalité embryonnaire (Tsang et al., 1998) et l'interaction GATA-1/FOG-1 est essentielle pour l'érythropoïèse. Le rôle de cette interaction sera décrit plus en détails dans le paragraphe 2.2.1.

GATA-1 interagit avec de nombreux facteurs hématopoïétiques tels que les Krüppel-Like Factors Sp1 et EKLF. Cette interaction a un rôle dans la transcription de gènes érythroïdes (Merika and Orkin, 1995). GATA-1 interagit également avec RUNX1 (Elagib et al., 2003) et Fli-1 (Eisbacher et al., 2003) au cours de la différenciation mégacaryocytaire. Un autre partenaire de GATA-1 est le facteur de transcription hématopoïétique PU.1. L'interaction GATA-1/PU.1 conduit à une inhibition mutuelle de

ces deux facteurs : PU.1 inhibe GATA-1 dans le lignage myéloïde, et GATA-1 inhibe PU.1 dans le lignage érythroïde (Rekhtman et al., 1999; Zhang et al., 1999, 2000; Nerlov et al., 2000). GATA-1 a également été impliqué dans le complexe Lmo2/Ldb1/Tal1/E2A permettant l'activation de promoteurs contenant un site GATA et une E-box (Wadman et al., 1997). Une interaction avec le facteur hématopoïétique Gfi-1b a aussi été montrée (Rodriguez et al., 2005).

Une interaction avec les Histone AcétylTransférases CBP et P300 a été montrée *in vitro* et *in vivo* (Blobel et al., 1998), et plus récemment avec le complexe répressif MeCP1 (contenant NuRD) et le complexe de remodelage de la chromatine ACF/WCRF (Rodriguez et al., 2005).

GATA-1 est aussi capable d'interagir avec lui-même. Cette dimérisation est importante pour la régulation de promoteurs contenant plusieurs motifs GATA, comme par exemple le promoteur de GATA-1 lui-même (Crossley et al., 1995).

Récemment, il a été montré que GATA-1 interagit également avec la protéine du Rétinoblastome pRb (Kadri et al., 2009). La protéine pRb est une protéine ubiquitaire impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. L'interaction GATA-1/pRb a un rôle majeur dans l'érythropoïèse. Ceci sera plus amplement décrit dans le paragraphe 2.2.2.

Une interaction directe entre GATA-1 et p53 conduisant à l'inhibition de p53 a été montrée *in vitro*. Cette interaction permettrait d'éviter l'activation de la voie p53 et ainsi l'apoptose qui pourrait être déclenchée par les nombreuses modifications morphologiques de la différenciation érythroïde terminale (Trainor et al., 2009).

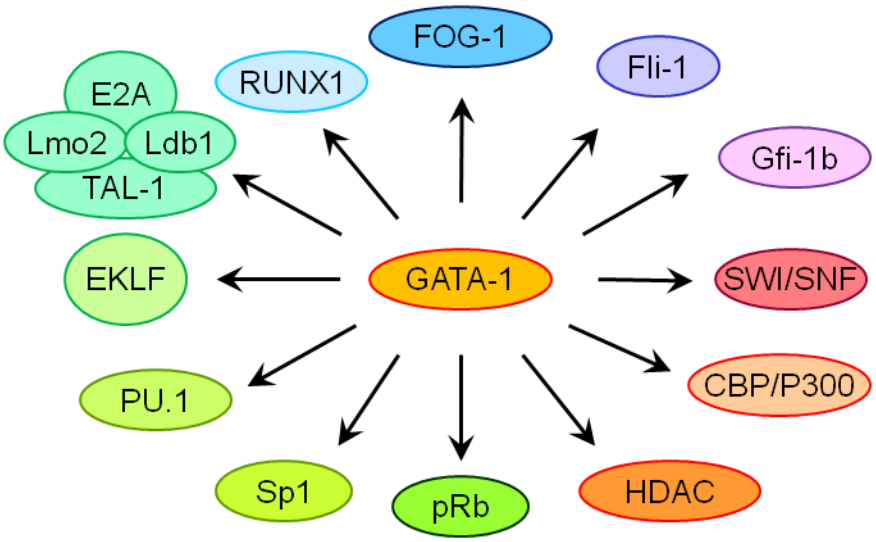


Illustration 21 : <u>Partenaires de GATA-1</u>
GATA-1 interagit avec de nombreux partenaires parmi lesquels son cofacteur FOG-1, la protéine du cycle cellulaire pRb, des facteurs hématopoïétiques (RUNX-1, Fli-1, EKLF, Sp1, Gfi-1b, PU.1, le complexe Lmo2/Ldb1/TAL-1/E2A), ou des modificateurs de la chromatine (SWI/SNF, CBP/P300, HDAC).

Selon les facteurs, les interactions de GATA-1 avec ses partenaires impliquent différents domaines de la protéine : le domaine N-terminal ou les doigts de zinc. Des mutations de ces différents domaines sont associées à des pathologies humaines. Les mutations conduisant à la délétion du domaine d'activation N-terminal sont associées notamment à des syndromes myéloprolifératifs chez des patients atteints de trisomie 21, et les mutations du doigt de zinc N-terminal sont associées à des anémies dysérythropoïétiques et des thrombocytopénies (**Illustration 22**). Ces deux types de mutations peuvent donc avoir un impact sur les interactions de GATA-1 avec ses partenaires. Ce chapitre détaillera plus particulièrement les interactions de GATA-1 avec deux de ses partenaires : **FOG-1**, interagissant avec le doigt de zinc N-terminal de GATA-1, et **pRb** dont la liaison à GATA-1 implique le domaine d'activation N-terminal.

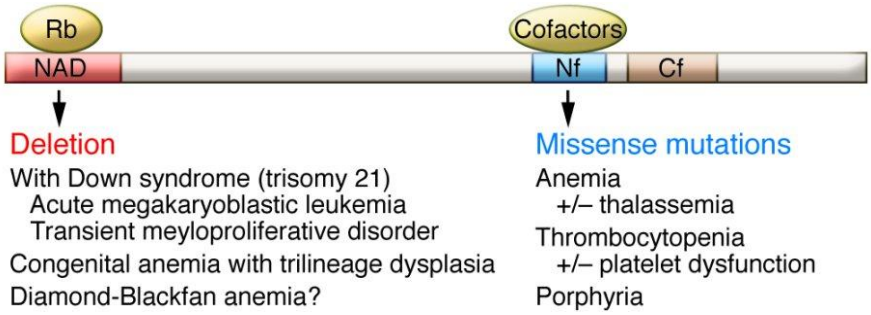


Illustration 22 : <u>Mutations de GATA-1 associées à des pathologies humaines</u> (Weiss et al., 2012)
Deux types de mutations de GATA-1 sont associées à des pathologies humaines : les mutations conduisant à la délétion du domaine d'activation N-terminal (NAD), impliqué dans la liaison à pRb, sont associées à des syndromes myéloprolifératifs chez les patients atteints de trisomie 21 ; les mutations du doigt de zinc N-terminal (Nf), responsable notamment de l'interaction GATA-1/FOG-1, conduisent à des anémies ou des thrombocytopénies.

2.2.1. <u>Interaction GATA-1/FOG-1</u>

2.2.1.a. Le cofacteur FOG-1

A la fin des années 1990, une nouvelle famille de protéines à doigts de zinc, interagissant avec les facteurs GATA, a été identifiée : les protéines FOG (Friend Of GATA-1) (Tsang et al., 1997). Elle se compose de deux membres : FOG-1 (Tsang et al., 1997) et FOG-2 (Svensson et al., 1999; Tevosian et al., 1999). Ces protéines ne sont pas capables de se lier à l'ADN. *In vitro*, les protéines FOG-1 et FOG-2 sont toutes deux capables d'interagir avec les six membres de la famille GATA via leurs doigts de zinc respectifs. Mais ces protéines ne sont pas toutes exprimées dans les mêmes tissus. En effet, FOG-1 est exprimé principalement dans le système hématopoïétique et sert de cofacteur à GATA-1 et GATA-2 dans les lignées érythroïde et mégacaryocytaire. Il a également un rôle de répresseur sur

l'activité de GATA-3 dans la lignée lymphocytaire. FOG-2, quant à lui, est exprimé principalement dans le cœur, le cerveau, les gonades, le foie et les poumons. Ce profil d'expression est corrélé avec celui des facteurs GATA-4, -5 et -6 (Cantor and Orkin, 2005).

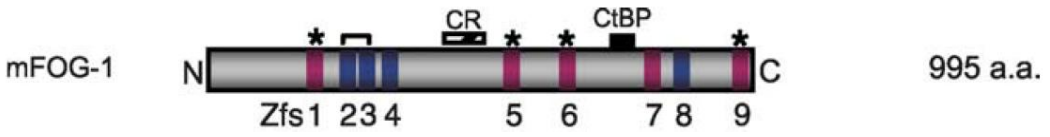


Illustration 23 : <u>Structure schématique de la protéine FOG-1 murine</u> (Cantor and Orkin, 2005)
La protéine FOG-1 comporte 995 acides aminés et contient 9 doigts de zinc. Les doigts de zinc de type C2H2 sont indiqués en bleu, ceux de type C2HC en rose. Les doigts de zinc impliqués dans l'interaction avec GATA-1 sont marqués par un astérisque. CR indique une région de forte homologie avec les autres protéines FOG de vertébrés. Le domaine de liaison au corépresseur CtBP est indiqué.

La protéine murine FOG-1 (ou ZFPM1) comporte 995 acides aminés (110 kDa). Elle contient 9 domaines à doigt de zinc répartis sur toute la séquence (ZF1 à ZF9). Quatre sont de type classique C_2H_2 (ZF2, 3, 4 et 8) et cinq de type C_2HC. L'interaction avec les facteurs GATA se fait via les domaines ZF1, 5, 6 et 9. Chez la souris, FOG-1 est exprimé dès E8.5 dans les îlots sanguins du sac vitellin. À partir d'E12.5, il est fortement exprimé dans le foie, siège de l'hématopoïèse fœtale. Chez l'adulte, il est présent dans la rate, organe hématopoïétique chez la souris, ainsi que dans le foie et le testicule. Au sein du système hématopoïétique, l'expression de FOG-1 est restreinte à certains types cellulaires. En effet, il est fortement exprimé dans les progéniteurs multipotents, les cellules érythroïdes et les mégacaryocytes, et plus faiblement dans les cellules souches hématopoïétiques et les cellules lymphoïdes. FOG-1 n'est pas exprimé dans les macrophages, les éosinophiles et les mastocytes. Ce profil d'expression coïncide en partie avec celui de GATA-1.

GATA-1 interagit avec FOG-1 via son doigt de zinc N-terminal, et en particulier grâce à quelques résidus clés conservés dans les doigts de zinc N-terminaux des autres membres de la famille GATA (Fox et al., 1998). FOG-1, quant à lui, lie le doigt de zinc N-ter de GATA-1 principalement via son sixième doigt de zinc (ZnF6), mais également via les ZnF1, 5 et 9 (Fox et al., 1998, 1999).

2.2.1.b. Fonctions physiologiques de FOG-1 et du complexe GATA-1/FOG-1

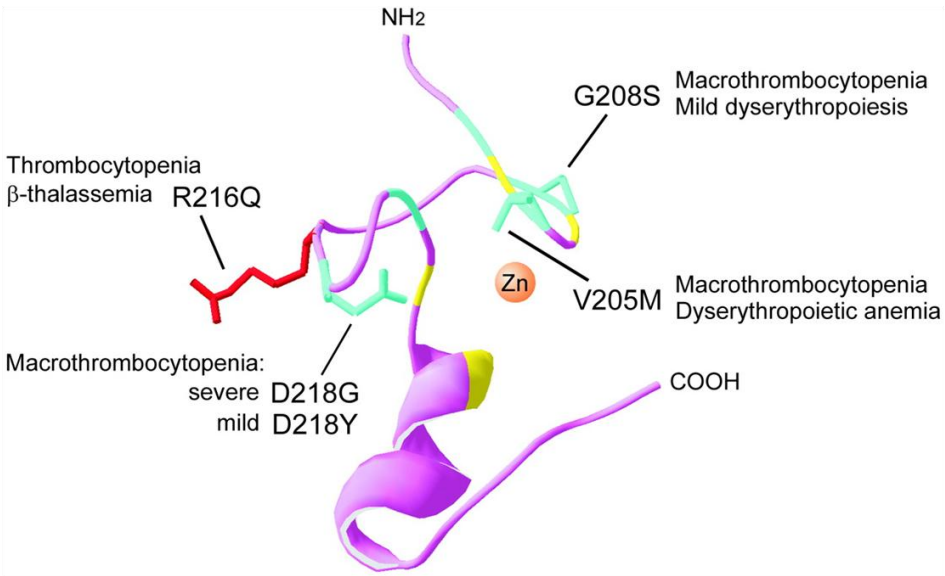
FOG-1 joue un rôle majeur dans l'érythropoïèse puisque des souris invalidées pour le gène *fog-1* (*fog-1*$^{-/-}$) meurent d'anémie sévère entre 10.5 et 12.5 jours de vie embryonnaire (E10.5-E12.5). Elles présentent un arrêt de la maturation érythroïde à un stade similaire à celui observé chez les souris *gata-1*$^{-}$. Par contre, contrairement aux souris *gata-1*$^{-}$, les souris *fog-1*$^{-/-}$ présentent également une absence totale de mégacaryopoïèse, suggérant un rôle de FOG-1 indépendant de GATA-1 dans la formation des plaquettes (Tsang et al., 1998).

L'interaction GATA-1/FOG-1 est nécessaire à l'érythropoïèse. Tout d'abord, l'absence de l'une ou l'autre de ces protéines conduit à un phénotype identique : une létalité embryonnaire par anémie et un blocage de la différenciation érythroïde à un stade précoce similaire (Fujiwara et al., 1996; Tsang et al., 1998). D'autre part, il a été montré que des mutations de GATA-1 abrogeant l'interaction avec FOG-1 entraînent des défauts d'érythropoïèse.

En effet, un crible double-hybride chez la levure a permis d'identifier plusieurs mutants de GATA-1 incapables d'interagir avec FOG-1, mais ayant conservé leur capacité à lier l'ADN. Les auteurs de cette étude ont montré que ces mutants, en particulier GATA-1-V205G, ne permettent pas d'induire une différenciation érythroïde lorsqu'ils sont exprimés dans la lignée G1E. Ils montrent également qu'un mutant de FOG-1 (FOG-1-S706R) capable d'interagir avec GATA-1-V205G, permet de restaurer la différenciation érythroïde dans la même lignée. L'interaction GATA-1/FOG-1 est donc essentielle à la fonction de GATA-1 dans la différenciation érythroïde *in vitro* (Crispino et al., 1999). Elle est également nécessaire à sa fonction dans la différenciation mégacaryocytaire puisque la protéine GATA-1-V205G ne permet pas la maturation de mégacaryocytes *in vitro* (Muntean and Crispino, 2005).

Une mutation de GATA-1 sur la Valine 205 a d'ailleurs été décrite chez une famille atteinte d'anémie dysérythropoïétique et de thrombocytopénie liées à l'X. Les patients porteurs de la mutation, V205M, présentent des érythrocytes anormaux en taille (anisocytose) et en forme (poïkilocytose). L'étude de cette mutation montre que l'interaction avec FOG-1 est fortement réduite, et que la protéine GATA-1-V205M n'est pas capable d'induire la différenciation érythroïde de la lignée G1E *in vitro* (Nichols et al., 2000).

D'autres mutations de GATA-1 affectant son interaction avec FOG-1 ont été identifiées chez des patients : G208S (Mehaffey et al., 2001), D218G (Freson et al., 2001), D218Y (Freson et al., 2002), G208R (Del Vecchio et al., 2005). Comme le V205M, aucune de ces mutations n'a d'effet sur l'interaction de GATA-1 avec l'ADN. Ces mutations réduisent plus ou moins fortement l'interaction GATA-1/FOG-1 et sont associées à des défauts plus ou moins sévères de l'érythropoïèse et de la mégacaryopoïèse. On peut noter que la sévérité du phénotype est directement liée à l'intensité de l'interaction GATA-1/FOG-1 : plus l'interaction est réduite, plus le phénotype est sévère (**Illustration 24**). En effet, les mutations V205M et D218Y réduisent fortement la liaison GATA-1/FOG-1 et conduisent à une sévère anémie. Par contre, les mutations D218G et G208S affectent plus faiblement l'interaction et induisent une légère dysérythropoïèse (D218G) voire aucun défaut du lignage érythroïde (G208S). La mutation G208R conduit aussi à un phénotype relativement sévère, on peut alors supposer que la substitution d'une Glycine par une Arginine, acide aminé beaucoup plus gros, affecte fortement l'interaction GATA-1/FOG-1 (Crispino, 2005; Ciovacco et al., 2008).



Summary of *GATA1* missense mutations in anemia/thrombocytopenia			
Mutation	FOG1- binding	DNA- binding	Phenotype
V205M	Strongly reduced	Normal	Macrothrombocytopenia, Dyserythropoietic anemia
D218G	Reduced	Normal	Macrothrombocytopenia, Dyserythropoiesis without anemia
D218Y	Strongly reduced	Normal	Macrothrombocytopenia, anemia
G208S	Reduced	Normal	Macrothrombocytopenia
R216Q	Normal	Reduced binding to complex and palindromic sites	Macrothrombocytopenia, β-thalassemia

Illustration 24 : <u>Des mutations de GATA-1 abrogeant l'interaction GATA-1/FOG-1 sont associées à des pathologies humaines</u> (Crispino, 2005; Ferreira et al., 2005)
Plusieurs mutations de GATA-1 affectant son affinité pour FOG-1 entraînent des défauts d'érythropoïèse chez l'homme. La sévérité du phénotype est directement corrélée à la stabilité de l'interaction GATA-1/FOG-1.

Pour étudier le rôle de l'interaction GATA-1/FOG-1 *in vivo*, un modèle murin exprimant la protéine GATA-1-V205G a été créé par une stratégie de Knock-In (Chang et al., 2002). La plupart des mâles hémizygotes GATA-1-V205G meurent d'anémie sévère à E11.5. Quelques-uns survivent jusqu'à la naissance, mais souffrent d'anémie et de thrombocytopénie et meurent peu après. Les érythrocytes du sac vitellin d'embryons mutés observés à E10.5 présentent un arrêt de maturation à un stade précoce similaire à celui observé chez les souris *fog-1*$^{-/-}$ et *gata-1*$^{-}$, ainsi que sur les érythrocytes humains GATA-1-V205M (Fujiwara et al., 1996; Tsang et al., 1998; Nichols et al., 2000). Cette étude démontre l'importance de l'interaction GATA-1/FOG-1 pour le développement érythroïde normal *in vivo*.

Un second modèle murin, utilisant cette fois un transgène, a été créé par Shimizu et coll. (Shimizu et al., 2004). Les auteurs ont établi des lignées transgéniques de souris exprimant la protéine GATA-1-V205G sous contrôle d'une partie du promoteur de GATA-1 : le domaine G1HRD. Les différentes

lignées, exprimant le transgène à différents niveaux, ont ensuite été croisées avec des souris GATA-1.05. La surexpression de GATA-1-V205G permet de supprimer la létalité embryonnaire des souris GATA-1.05, qui survivent alors jusqu'à l'âge adulte. Ceci est cohérent avec l'étude de Crispino et coll. dans laquelle la surexpression de FOG-1 permet la différenciation érythroïde de quelques cellules G1E en présence de GATA-1-V205G (Crispino et al., 1999). Ces individus transgéniques présentent cependant une thrombocytopénie, des défauts de prolifération et de maturation des mégacaryocytes, ainsi qu'une érythropoïèse de stress atténuée. Ce phénotype est similaire à celui observé chez les patients portant la mutation GATA-1-V205M (Nichols et al., 2000). Par contre, à un niveau d'expression similaire à l'endogène, GATA-1-V205G permet la survie de seulement quelques individus, dont très peu survivent jusqu'à l'âge adulte. Les nouveau-nés souffrent d'anémie sévère et de jaunisse, accompagnée d'anisocytose et de sphérocytose. L'expression de gènes codant pour des protéines de membranes (*band-3*, *spectrin* et *aquaporin-1*) est fortement diminuée, tandis que l'expression d'autres gènes cibles de GATA-1 comme *Alas2* (codant pour l'enzyme catalysant la première étape de la chaîne de biosynthèse de l'hème) est peu affectée. La perte de l'interaction GATA-1/FOG-1 entraîne une déficience de protéines membranaires et perturbe la fonction de GATA-1 dans le maintien de l'homéostasie érythroïde (Hasegawa et al., 2012).

Ce second modèle (Shimizu et al., 2004; Hasegawa et al., 2012) montre qu'il est possible de corriger un phénotype létal par modification du ratio des protéines. Bresnick et coll. ont également montré qu'il était possible de corriger le phénotype du mutant GATA-1-V205G *in vitro* par une modification post-traductionnelle telle que la sumoylation. En effet, l'ajout d'un groupement SUMO-1 en N-terminal de la protéine GATA-1-V205G permet de restaurer son occupation de la chromatine au locus β-globine, ainsi que l'activation de certains de ses gènes cibles comme *β-major*, *α-globine*, ou *Abcb10* (Lee et al., 2009).

Toutefois, si le phénotype létal est corrigé *in vivo*, les souris adultes exprimant la protéine GATA-1-V205G présentent encore des défauts majeurs de l'érythropoïèse, en particulier au niveau de la structure de la membrane des globules rouges (Hasegawa et al., 2012).

L'ensemble de ces études montre l'importance de l'interaction GATA-1/FOG-1 pour la différenciation érythroïde *in vitro* et *in vivo*, et notamment, comme le montre l'étude de Hasegawa et coll., pour la régulation des protéines membranaires des globules rouges.

2.2.1.c. Régulation transcriptionnelle par les facteurs GATA-1 et FOG-1

Nous avons vu précédemment que l'interaction GATA-1/FOG-1 est importante pour l'érythropoïèse. En effet, le facteur de transcription GATA-1 et son cofacteur FOG-1 coordonnent la

maturation des cellules érythroïdes en activant des gènes érythroïde-spécifiques et en réprimant des gènes associés à l'état indifférencié. L'interaction GATA-1/FOG-1 est donc importante pour l'activité transcriptionnelle de GATA-1.

Certains gènes cibles de GATA-1 nécessitent l'interaction avec FOG-1 pour leur activation transcriptionnelle. Plusieurs études ont montré que la mutation GATA-1-V205G abrogeant l'interaction GATA-1/FOG-1 inhibe l'activation de certains gènes cibles tels que *β-major*, *α-globine*, *DC11*, *HD2* (Crispino et al., 1999), *Ahsp*, *Alas2*, *Abcd10* (Lee et al., 2009), ainsi que des gènes codant pour les protéines de la membrane comme *Slc4a1* (Band3), *Spna1* (α-Spectrine) ou *Aqp1* (Aquaporine) (Hasegawa et al., 2012).

GATA-1 peut aussi activer ses cibles de manière FOG-1-indépendante. L'expression de GATA-1-V205G-ER dans les G1E induit l'expression de *HRI* (Heme-Regulated eIF-α-kinase), *Eklf*, *Fog1* et *Tac2* (Crispino et al., 1999; Johnson et al., 2006). Certaines cibles de GATA-1 nécessitent même l'absence de FOG-1 pour leur activation. En effet, une étude a montré, dans modèle non érythroïde d'expression transitoire, qu'en absence de FOG-1, le promoteur du gène *Eklf* est fortement activé par GATA-1, mais lorsque des quantités croissantes de FOG-1 sont introduites, on observe une répression dose-dépendante de l'activation d'*Eklf* par GATA-1 (Fox et al., 1999). De plus, le développement des mastocytes nécessite la présence de GATA-1 et l'absence de FOG-1. En effet, l'expression exogène de FOG-1 dans les mastocytes conduit au déplacement de GATA-1 des gènes mastocytaires et induit leur down-régulation (Chlon et al., 2012).

GATA-1 a également une activité répressive dépendante de FOG-1. La répression des gènes *Gata-2*, *c-myc*, et *Tac-2* par exemple nécessite l'interaction GATA-1/FOG-1 (Crispino et al., 1999; Johnson et al., 2006). Différentes études ont montré que GATA-1/FOG-1 exerce son activité répressive grâce au recrutement par FOG-1 de complexes répresseurs comme MeCP1 qui contient NuRD, un complexe comportant des activités d'histone désacétylase et de remodelage du nucléosome interagissant avec la partie N-terminale de FOG-1 (Hong et al., 2005; Rodriguez et al., 2005). L'abrogation de l'interaction FOG-1/NuRD entraîne une anémie et une thrombocytopénie associées à une splénomégalie chez la souris, soulignant l'importance de l'activité répressive de GATA-1/FOG-1/NuRD (Gregory et al., 2010).

Enfin, il existe aussi un mécanisme de répression des gènes par GATA-1 indépendant de FOG-1. En effet, dans les G1E, GATA-1 et GATA-1-V205G répriment plusieurs gènes cibles comme *Lyl1*, *Rgs1*, *Rgs18*, *Treml2* et *Clec4d* de la même manière, et GATA-1 réprime également ces gènes dans une lignée déficiente pour FOG-1 (FOG-1^{null}) (Johnson et al., 2007).

GATA-1 régule donc ses cibles transcriptionnelles par différents mécanismes impliquant ou non son cofacteur FOG-1 selon les gènes ciblés :

- activation FOG-1-dépendante,
- activation FOG-1-indépendante,
- répression FOG-1-dépendante,
- répression FOG-1-indépendante,
- activation FOG-1-indépendante couplée à une répression FOG-1-dépendante.

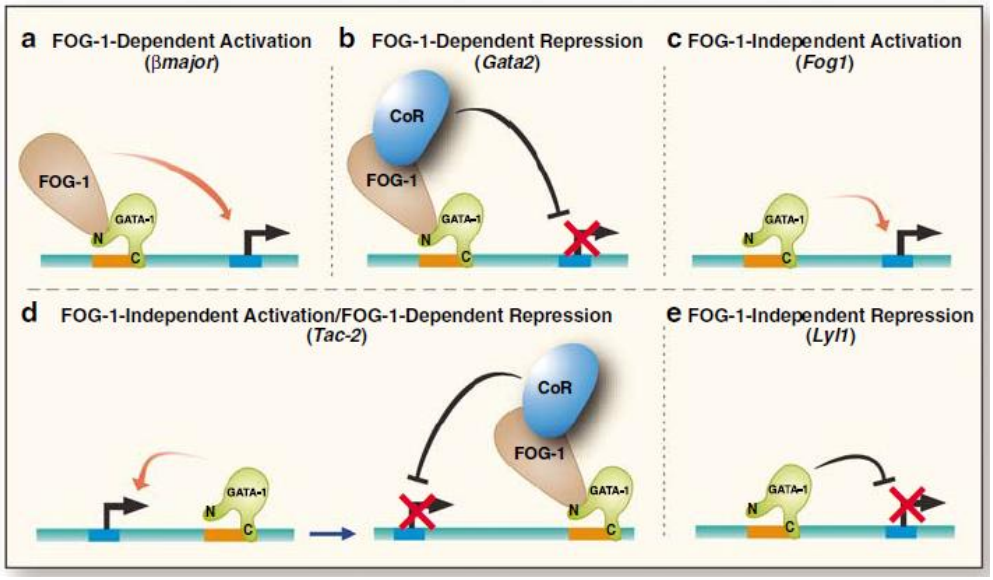


Illustration 25 : <u>Différents mécanismes de régulation transcriptionnelle par GATA-1</u> (Kim and Bresnick, 2007)
a. GATA-1 utilise FOG-1 pour activer certaines cibles. **b.** GATA-1 utilise FOG-1 pour réprimer certaines cibles. **c** et **e.** GATA-1 active ou réprime certaines cibles en absence de FOG-1. **d.** L'activation du gène cible par GATA-1 est indépendante de FOG-1, mais la présence de FOG-1 permet ensuite la répression de ce gène. Un exemple de gène régulé par chaque mécanisme est indiqué entre parenthèses.

Par ailleurs, FOG-1 facilite l'occupation de la chromatine par GATA-1 à certains sites et est requis pour les switch de GATA, c'est-à-dire le remplacement de GATA-2 par GATA-1 à certains sites GATA du génome (Letting et al., 2004; Pal et al., 2004). De plus, l'interaction GATA-1/FOG-1 est nécessaire pour l'occupation de la chromatine par GATA-1 sur certains sites comme HS2 (DNase I Hypersensitive Site 2) sur le locus β-globine, mais n'est pas indispensable sur d'autres comme le promoteur d'*Eklf*. Sur le gène *Gata-2*, réprimé par GATA-1, l'interaction avec FOG-1 n'est pas nécessaire pour l'occupation par GATA-1 mais est nécessaire pour l'inhibition transcriptionnelle et la désacétylation des histones (Letting et al., 2004). GATA-1 occupe des sites chromatiniens différents en fonction du complexe dans lequel il est impliqué. Par exemple, sur le locus α-globine, les complexes GATA-1/FOG-1 et GATA-1/TAL-1/Ldb1 occupent des sites différents (Anguita et al., 2004; Rodriguez et al., 2005).

Tous ces éléments indiquent que l'interaction GATA-1/FOG-1 est importante pour l'activation ou la répression de certains gènes, mais ils montrent surtout que la régulation de l'interaction GATA-1/FOG-1 est cruciale pour l'activité transcriptionnelle correcte de GATA-1. Les mécanismes assurant cette régulation ne sont pas encore entièrement élucidés. Il a été suggéré que la protéine TACC3, dont l'invalidation entraîne une anémie létale embryonnaire (Piekorz et al., 2002), pourrait jouer ce rôle en séquestrant FOG-1 dans le cytoplasme (Garriga-Canut and Orkin, 2004).

2.2.2. Interaction GATA-1/pRb

2.2.2.a. La protéine du rétinoblastome pRb

La protéine du rétinoblastome pRb est un suppresseur de tumeur. Elle est fonctionnellement inactivée dans la majorité des cancers humains. C'est un régulateur central du cycle cellulaire. pRb est un membre de la famille de protéines appelée « pocket protein family » comprenant également p107 et p130. Elles portent ce nom à cause de leur domaine hydrophobe en forme de poche situé en C-terminal et servant à la plupart de leurs interactions protéines-protéines. Grâce à cette poche hydrophobe, les protéines Rb interagissent avec de nombreuses protéines contenant un domaine spécifique de liaison à Rb de séquence consensus LxCxE (pour revue : Morris and Dyson, 2001).

pRb est une phosphoprotéine nucléaire ubiquitaire de 110kDa, impliquée dans la régulation de la transition G1/S du cycle cellulaire. La forme hypophosphorylée de pRb interagit avec les facteurs de transcription E2F pour réprimer leur activité. Les facteurs E2F induisent la transcription de gènes permettant la progression du cycle cellulaire, en particulier l'entrée en phase S, notamment des gènes nécessaires à la réplication de l'ADN ainsi que les cyclines A et E. pRb réprime l'activité des facteurs E2F1, E2F2 et E2F3 en recrutant des histones désacétylases (HDAC) et d'autres facteurs remodeleurs de la chromatine sur leurs promoteurs. Cette activité de pRb est appelée « répression active ». pRb bloque ainsi l'entrée en phase S en réprimant l'activité transcriptionnelle de E2F. L'interaction pRb/E2F est inhibée par la phosphorylation de pRb sur 13 résidus Sérine et Thréonine médiée par les complexes Cdk4/cyclineD, Cdk6/cyclineD ou Cdk2/cyclineE. La phosphorylation de pRb entraîne la libération d'E2F, permettant ainsi la reprise du cycle cellulaire (pour revues : Du and Pogoriler, 2006; Giacinti and Giordano, 2006).

pRb est nécessaire à l'arrêt du cycle cellulaire associé à la quiescence, la sénescence et la différenciation terminale de différents tissus. L'inactivation de pRb mène à un cycle cellulaire aberrant dans des cellules post-mitotiques *in vitro* et *in vivo*. pRb induit également la survie cellulaire via la séquestration d'E2F. En effet, l'expression ectopique des facteurs E2F induit l'apoptose *in vitro*

et *in vivo*. De plus, les cellules $Rb^{-/-}$ sont plus sensibles à la mort cellulaire induite par des dommages de l'ADN. Les souris $Rb^{-/-}$ meurent entre E13 et E15 avec des défauts importants dans le développement érythroïde, neuronal et oculaire, ainsi que dans les muscles squelettiques. Ces anomalies sont associées à des défauts partiels de la différenciation, une apoptose augmentée, ainsi que des cycles cellulaires ectopiques. En plus des modifications du cycle et de l'insensibilité à plusieurs signaux d'arrêt en G1 observés dans les cellules déficientes pour Rb, les cellules issues des embryons $Rb^{-/-}$ présentent des défauts de la myogenèse et de l'adipogenèse. Rb a donc de multiples fonctions *in vivo* (pour revues : Classon and Harlow, 2002; Sherr and McCormick, 2002; Macleod, 2008). Il a notamment un rôle essentiel dans l'érythropoïèse puisque des délétions de Rb sont souvent associées à des phénotypes érythropoïétiques sévères voire létaux chez la souris. Le **Tableau 1** résume les différents modèles créés et les phénotypes érythropoïétiques associés.

Allèle Rb1 muté	Génotype	Tissus concernés	Phénotype érythropoïétique	Références
$Rb^{x3t/x3t}$	*Rb1*-null	Tous les tissus	Défaut de maturation érythroïde (pas de sortie du cycle cellulaire, diminution des érythroblastes Ter119+ et absence d'énucléation) conduisant à une anémie. Létalité vers E13.5	(Clark et al., 2004; Iavarone et al., 2004; Spike et al., 2004)
$Rb^{x3t/x3t}$	Foie fœtal *Rb1*-null transplanté	Moelle osseuse de l'hôte, rate et sang	Anémie (diminution GR, réticulocytose), augmentation des érythroblastes CD71+, hyperplasie myéloïde, hématopoïèse extra-médullaire (foie et rate), insuffisance médullaire, létalité 2-6 mois post-transplantation	(Spike et al., 2004)
$Rb^{x3t/x3t}$	Wt ; $Rb1^{-/-}$ chimères	Tous les tissus sauf le placenta	Légère augmentation des cellules érythroïdes immatures nucléées dans le sang à E13.5 qui disparaît à E15.5 ; l'hématopoïèse adulte paraît normale, un stress érythroïde induit des défauts érythroïdes dans les cellules *Rb1*-null malgré la présence de cellules sauvages (en particulier les macrophages)	(Maandag et al., 1994; Williams et al., 1994; Spike et al., 2004)
$Rb^{x3t/x3t}$	$Rb1^{-/-}$; $E2f2^{-/-}$	Tous les tissus	La perte d'E2F2 supprime les défauts de maturation des érythroblastes *Rb1*-null, mais n'améliore pas les défauts placentaires des souris *Rb1*-null. Létalité vers E16.5	(Dirlam et al., 2007)
$Rb^{x3t/x3t}$	$Rb1^{-/-}$; $Id2^{-/-}$	Tous les tissus	La perte d'Id2 supprime les défauts de maturation érythroïde. Létalité autour de la naissance	(Iavarone et al., 2004)
$\boldsymbol{Rb^{flox/flox}}$ **Δexon19**	*Meox2*-Cre	Tissus embryonnaires (pas le placenta)	Légère augmentation des cellules érythroïdes immatures (similaire aux chimères Wt ; $Rb1^{-/-}$). Viables jusqu'à la naissance	(Spike et al., 2004)
$\boldsymbol{Rb^{flox/flox}}$ **Δexon19**	*Cyp19*-Cre	Placenta	Légère augmentation des cellules érythroïdes immatures (similaire aux chimères Wt ; $Rb1^{-/-}$). Létalité vers E15.5	(Lipinski et al., 2001)
$\boldsymbol{Rb^{flox/flox}}$ **Δexon19**	*EpoR*-Cre	Erythroblastes embryonnaires et adultes	Anémie normocytaire ; érythropoïèse extra-médullaire (rate) ; défauts de maturation intrinsèques des GR (pas de sortie du cycle cellulaire, masse mitochondriale réduite et augmentation des érythroblastes CD71+). Individus viables.	(Sankaran et al., 2008)
$\boldsymbol{Rb^{1lox/1lox}}$	*Mox2*-Cre	Tissus embryonnaires (pas le placenta)	Défauts de maturation érythroïde (pas de sortie du cycle cellulaire, diminution des érythroblastes basophiles, augmentation des érythroblastes acidophiles), augmentation des cellules apoptotiques	(Zhang et al., 2010)

Tableau 1 : <u>Résumé des phénotypes érythropoïétiques associés à des délétions de Rb chez la souris</u> (d'après Macleod, 2008). **GR** : globules rouges.

2.2.2.b. Rb dans l'érythropoïèse : le conflit intrinsèque/extrinsèque

La régulation du cycle cellulaire est intimement liée à la différenciation érythroïde, mais la façon dont ces processus sont couplés n'est pas bien connue. La protéine Rb, régulateur majeur du cycle cellulaire, joue un rôle important dans l'érythropoïèse. Cependant, la nature exacte de ce rôle est sujette à controverse depuis plus de 15 ans.

Les souris $Rb^{-/-}$ meurent à environ E14.5 avec plusieurs défauts de développement, notamment un défaut de la maturation érythroïde causant une anémie qui est probablement la cause de la létalité (Clarke et al., 1992; Jacks et al., 1992; Lee et al., 1992). Les foies fœtaux $Rb^{-/-}$ contiennent moins de CFU-e et BFU-e, et les colonies formées sont peu hémoglobinisées, suggérant un défaut de différenciation érythroïde (Jacks et al., 1992).

Des travaux ultérieurs ont montré que dans des souris chimères, les cellules Rb^{null} contribuent à la formation des érythrocytes matures, suggérant que les défauts érythroïdes des souris knock-out $Rb^{-/-}$ n'étaient pas dus à un effet autonome-cellulaire (Maandag et al., 1994; Williams et al., 1994). L'hypothèse du rôle extrinsèque de Rb est soutenue par le fait que de nombreux défauts embryonnaires de ces souris peuvent être expliqués par un défaut placentaire du à l'absence de pRb additionné d'une déficience des échanges fœtaux-maternels (Wu et al., 2003; Wenzel et al., 2007). Le rôle de pRb serait alors placentaire.

Cependant, la transplantation de progéniteurs érythroïdes de foies fœtaux a montré que l'érythropoïèse n'est pas complètement normale en l'absence de pRb dans les cellules érythroïdes (Hu et al., 1997). Ces observations seraient plutôt en faveur d'un rôle intrinsèque de pRb.

Des études ultérieures ont donné des résultats conflictuels. Il a été supposé que Rb pourrait avoir un rôle intrinsèque au type cellulaire mais pas intrinsèque à la cellule elle-même (non autonome-cellulaire) dans l'érythropoïèse (Whyatt and Grosveld, 2002). Des études de souris chimères et de transplantation suggèrent que Rb serait nécessaire uniquement à l'érythropoïèse de stress. En conditions de stress, pRb est requis pour réguler l'expansion des érythroblastes et induire l'énucléation des réticulocytes. Une délétion de Rb *in vitro* induit des défauts du cycle et de la différenciation similaires à ceux observés *in vivo*. pRb aurait un rôle intrinsèque à la cellule au cours de l'érythropoïèse de stress (Spike et al., 2004). Grâce à des approches de culture *in vitro*, une équipe a proposé que Rb joue un rôle intrinsèque dans la maturation érythroïde. La perte de la fonction de pRb dans des cellules érythroïdes primaires conduit à l'inhibition de la sortie du cycle et de la différenciation terminale. Des études de co-cultures montrent que Rb est nécessaire de manière intrinsèque à la différenciation érythroïde terminale (Clark et al., 2004).

D'autres études suggèrent au contraire que pRb n'est pas indispensable dans les cellules érythroïdes mais nécessaire dans les macrophages pour la formation d'un îlot érythroblastique intact *in vitro* (Iavarone et al., 2004).

Le groupe de Macleod suggère à nouveau un rôle intrinsèque de pRb en montrant que les érythroblastes Rb^{null} sont incapables de s'énucléer à cause de défauts dans le dernier cycle cellulaire avant la différenciation terminale. Ces défauts seraient dus à la dérégulation d'E2F2 (Dirlam et al., 2007).

Finalement, une étude *in vivo* a montré grâce à une délétion spécifique de pRb dans le lignage érythroïde, que Rb a un rôle intrinsèque au type cellulaire et intrinsèque à la cellule (autonome-cellulaire) dans l'érythropoïèse (Sankaran et al., 2008). Son absence induit une érythropoïèse inefficace avec un blocage de la maturation terminale des érythroblastes. Cette étude montre qu'en plus d'un défaut dans la sortie du cycle cellulaire, l'absence de pRb empêche la biogenèse mitochondriale. Le rôle intrinsèque de Rb dans l'érythropoïèse serait alors médié par le couplage de la biogenèse mitochondriale à la sortie du cycle cellulaire. L'érythropoïèse en absence de pRb ressemble aux syndromes myélodysplasiques humains où l'on observe souvent des défauts de régulation du cycle et de la fonction mitochondriale.

2.2.2.c. Interaction GATA-1 / pRb

Une étude du laboratoire a montré que GATA-1 interagit directement avec pRb via un domaine LxCxE situé dans la partie N-terminale de GATA-1, et que cette interaction est nécessaire à la différenciation érythroïde terminale *in vitro* et *in vivo* (Kadri et al., 2009). En effet, l'expression d'une protéine GATA-1 ne pouvant plus lier Rb ($GATA\text{-}1^{Rb-}$) bloque la différenciation des cellules G1E. *In vivo*, un transgène codant pour $GATA\text{-}1^{Rb-}$ exprimé à un niveau équivalent à l'endogène ne permet pas de supprimer la létalité des souris GATA-1.05, et entraîne une anémie létale embryonnaire (E15.5). Cette étude montre que, dans des cellules érythroïdes de stade terminal issues de foie fœtal murin, GATA-1 s'associe uniquement à la forme hypophosphorylée de pRb déjà associée à E2F2. Le tricomplexe formé GATA-1/pRb/E2F2 inhibe la prolifération des précurseurs érythroïdes en altérant la transition G1/S, probablement en partie par la séquestration d'E2F2. Par ailleurs, FOG-1 est capable de déplacer GATA-1 hors de ce complexe *in vitro*. Ceci pourrait permettre la libération d'E2F2 après phosphorylation de Rb. Parallèlement, le complexe GATA-1/FOG-1 exerce ses effets trancriptionnels dans le cadre du programme de différenciation érythroïde. Il est probable que des inducteurs exogènes exercent une régulation fine puisque GATA-1 et pRb sont tous deux régulés par phosphorylation (Kadri et al., 2005).

Cette étude apporte une base moléculaire pour l'existence d'une composante intrinsèque au rôle de pRb en établissant un lien physique direct entre pRb/E2F2 et le facteur de transcription majeur de la différenciation érythroïde GATA-1. Elle apporte également une explication moléculaire supplémentaire au rôle antiprolifératif de GATA-1, ainsi que des éléments nouveaux pour la compréhension des différents phénotypes observés chez des patients exprimant uniquement la forme courte GATA-1s (Wechsler et al., 2002; Hollanda et al., 2006). En effet, le domaine LNCME permettant l'interaction avec pRb est situé dans la partie N-terminale de GATA-1 en position 81-85. Il est donc délété dans la forme de courte GATA-1s qui est traduite à partir de la Met84. Cependant, les protéines GATA-1s et GATA-1Rb- ne sont pas fonctionnellement équivalentes. Donc la partie N-terminale de GATA-1 doit avoir un rôle supplémentaire indépendant de Rb.

III. Situation du sujet

S'inscrivant dans la thématique commune de l'U962 (« Thérapie génique et contrôle de l'expansion cellulaire ») visant à contrôler l'expansion de cellules indifférenciées, l'objectif du laboratoire consiste à décrypter les mécanismes moléculaires régulant la balance entre prolifération et différenciation érythroïde terminale. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, deux types de facteurs sont impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse : des facteurs ubiquitaires tels que la voie de signalisation PI3K/Akt ou la protéine pRb, et des facteurs érythroïde-spécifiques comme les facteurs de transcription GATA-1 et FOG-1. De manière générale, les protéines ubiquitaires ont été impliquées dans le contrôle de la survie et la prolifération, tandis que les facteurs spécifiques sont décrits comme régulant la différenciation. Cependant, plusieurs éléments suggèrent des interconnexions entre ces deux types de facteurs.

Si l'on regarde notamment les modèles d'invalidation génique de ces différents acteurs, on remarque que l'invalidation des facteurs spécifiques GATA-1, FOG-1 ou l'abrogation de leur interaction (mutation GATA-1^{V205G}) entraîne une létalité embryonnaire due à des défauts de l'érythropoïèse primitive et définitive. L'analyse des cellules issues de ces différents embryons montre un arrêt de la différenciation au stade proérythroblaste (**Tableau 2**).

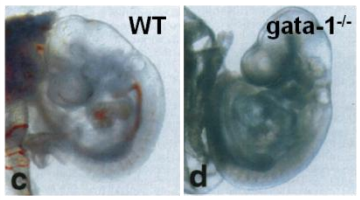
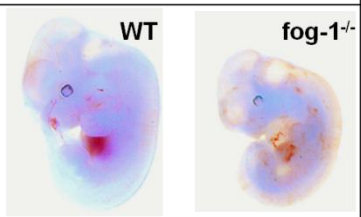
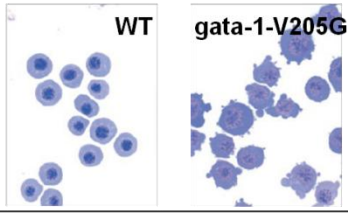
Génotype	Stade de développement		Phénotype	Références
gata-$1^{-/-}$	E9,5		Létal à E10,5 Défauts d'érythropoïèse primitive, blocage de la différenciation au stade proérythroblaste	Fujiwara et al., 1996
fog-$1^{-/-}$	E11,5		Létal à E10,5-E12,5 Défauts d'érythropoïèse primitive, blocage de la différenciation au stade proérythroblaste	Tsang et al., 1998
gata-1-V205G	E10,5 – érythrocytes du sac vitellin		Létal à E11,5 Blocage de la maturation érythroïde au stade proérythroblaste	Chang et al., 2002

Tableau 2 : <u>Invalidations géniques des facteurs érythroïde-spécifiques</u>
L'invalidation de GATA-1, FOG-1 ou l'abrogation de leur interaction entraîne une létalité embryonnaire entre E10.5-E12.5 par anémie avec blocage de la maturation érythroïde (Fujiwara et al., 1996; Tsang et al., 1998; Chang et al., 2002).

Si l'on compare l'invalidation des facteurs ubiquitaires PI3K et pRb au stade E14.5, on observe également des défauts de l'érythropoïèse définitive (**Tableau 3**).

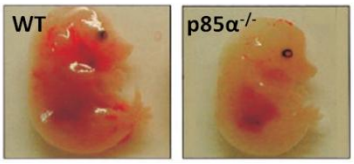
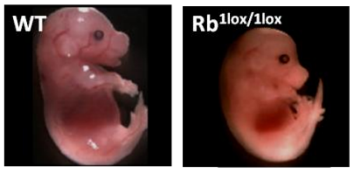
Génotype	Stade de développement		Phénotype	Références
$p85\alpha^{-/-}$	E14,5		Défauts de l'érythropoïèse définitive, diminution du nombre de BFU-e, CFU-e et d'érythrocytes matures.	Huddleston et al., 2003
$Rb^{1lox/1lox}$; Mox2cre/+	E15,5		Défauts de l'érythropoïèse terminale, diminution de la quantité d'érythroblastes basophiles avec accumulation des érythroblastes acidophiles.	Zhang et al., 2010

Tableau 3 : <u>Invalidations géniques des facteurs ubiquitaires</u>
L'invalidation de la sous-unité p85α de la PI3K et de pRb entraîne des défauts de l'érythropoïèse terminale au cours du développement (Huddleston et al., 2003; Zhang et al., 2010).

Ces éléments vont dans le sens d'une **implication globale de GATA-1/FOG-1 et pRb/PI3K/Akt dans l'étape de différenciation érythroïde terminale**.

Avant mon arrivée, deux études du laboratoire ont d'ailleurs établi des liens directs entre ces deux types de facteurs.
La première étude a montré que :

1) <u>GATA-1 est phosphorylé par Akt sur la Ser310 en réponse à la signalisation Epo/PI3K</u>, établissant pour la première fois un lien direct entre la signalisation Epo et le facteur de transcription érythroïde GATA-1 ;

2) <u>la phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 semble favoriser la différenciation érythroïde</u> puisque l'expression d'une protéine non phosphorylable ($GATA\text{-}1^{S310A}$) entraîne une hémoglobinisation des cellules de la lignée cellulaire *gata-1*$^{-/-}$ (G1E) réduite de 50% par rapport à la protéine GATA-1 sauvage (Kadri et al., 2005).

Dans le même ordre d'idée, Zhao et coll. montrent que l'expression de $GATA\text{-}1^{S310A}$ dans les mêmes cellules diminue l'induction d'expression de gènes érythroïdes GATA-1-dépendants comme *β-major* et *Alas2*, comparé à GATA-1 (Zhao et al., 2006).

Quel est alors le rôle moléculaire de la phosphorylation de GATA-1 et comment agit-elle sur la différenciation érythroïde ?

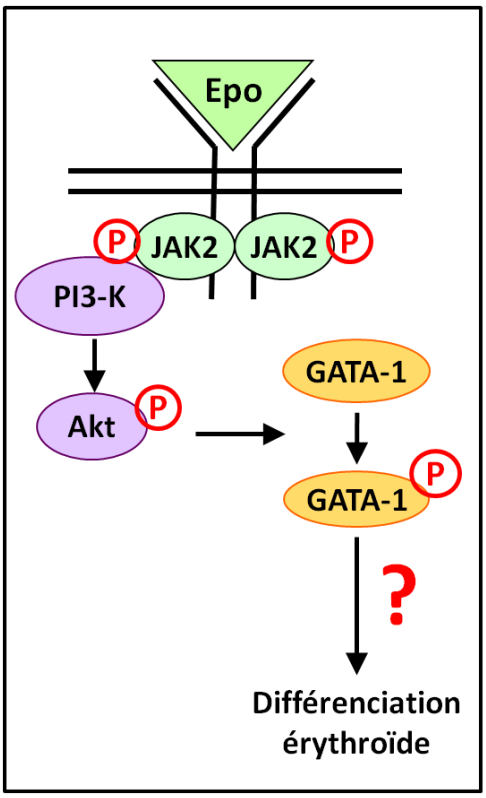


Illustration 26 : Quel est le rôle de la phosphorylation de GATA-1 dans la différenciation érythroïde ?
GATA-1 est phosphorylé sur la Ser310 par Akt en réponse à l'Epo. Cette phosphorylation semble jouer un rôle dans la différenciation érythroïde.

La seconde étude du laboratoire a montré que :

1) GATA-1 possède un domaine de liaison à pRb et forme un tricomplexe GATA-1/pRb/E2F capable d'inhiber la prolifération en induisant un blocage du cycle cellulaire en phase G1. Ces données apportent une explication moléculaire au rôle antiprolifératif de GATA-1 décrit depuis plusieurs années dans la littérature (Dubart et al., 1996; Rylski et al., 2003) ;

2) le blocage de la prolifération par GATA-1/pRb/E2F est une étape essentielle à l'érythropoïèse terminale car l'expression d'une protéine incapable de lier pRb (GATA-1^{Rb-}) bloque la différenciation érythroïde de la lignée G1E *in vitro*, et entraîne une létalité embryonnaire (E15.5) *in vivo* ;

3) le complexe GATA-1/pRb/E2F peut être déplacé par FOG-1 *in vitro*, proportionnellement à la quantité de FOG-1 présente, conduisant à la formation du complexe GATA-1/FOG-1, et induisant la reprise de la prolifération ;

Il existe alors un équilibre moléculaire entre le complexe GATA-1/pRb/E2F inhibant la prolifération cellulaire et le complexe GATA-1/FOG-1 permettant la différenciation érythroïde.

Quels sont les mécanismes moléculaires permettant la dissociation de GATA-1/pRb par FOG-1 et régulant ainsi l'équilibre moléculaire ?

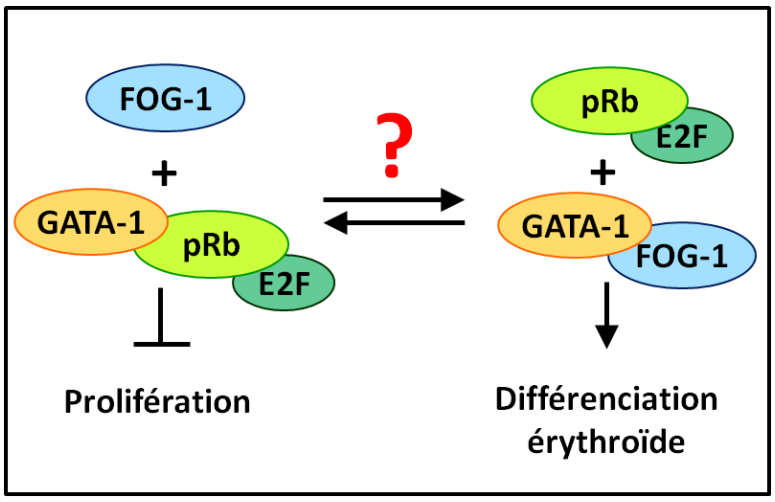


Illustration 27 : <u>Quels mécanismes régulent l'équilibre moléculaire entre GATA-1/pRb et GATA-1/FOG-1 ?</u>
GATA-1 forme un complexe avec la protéine pRb qui régule la prolifération. Ce complexe peut être déplacé par la présence de FOG-1.

Nous avons alors posé l'hypothèse que **la phosphorylation de GATA-1 par Akt permettrait de réguler l'équilibre moléculaire entre GATA-1/pRb et GATA-1/FOG-1, contrôlant ainsi la balance entre prolifération et différenciation érythroïde**.

Ainsi, mon travail de thèse s'articule en trois parties :

1) Quel est le rôle moléculaire de la phosphorylation de GATA-1 par Akt ?

Pour répondre à cette question, j'ai tout d'abord mis au point la visualisation de la phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 dans des modèles *in vitro*. J'ai ensuite étudié, dans ces mêmes modèles, l'effet de cette phosphorylation sur les interactions de GATA-1 avec ses partenaires (FOG-1 et pRb) puis sur les fonctions de GATA-1. Cette étude a permis d'établir un modèle moléculaire dans lequel la phosphorylation de GATA-1 régulerait sa répartition dans les deux complexes GATA-1/pRb et GATA-1/FOG-1.

2) Le modèle moléculaire établi peut-il être appliqué pour restaurer la différenciation érythroïde dans un modèle de pathologie humaine ?

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, il existe plusieurs mutations de GATA-1 abrogeant l'interaction GATA-1/FOG-1 qui entraînent chez des patients des défauts du développement érythropoïétique. La sévérité du phénotype est directement liée à l'affinité de GATA-1 pour FOG-1 : plus l'interaction est réduite, plus le phénotype est sévère. L'une de ces mutations, GATA-1-V205M/G, entraîne une létalité embryonnaire chez la souris et ne permet pas d'induire la

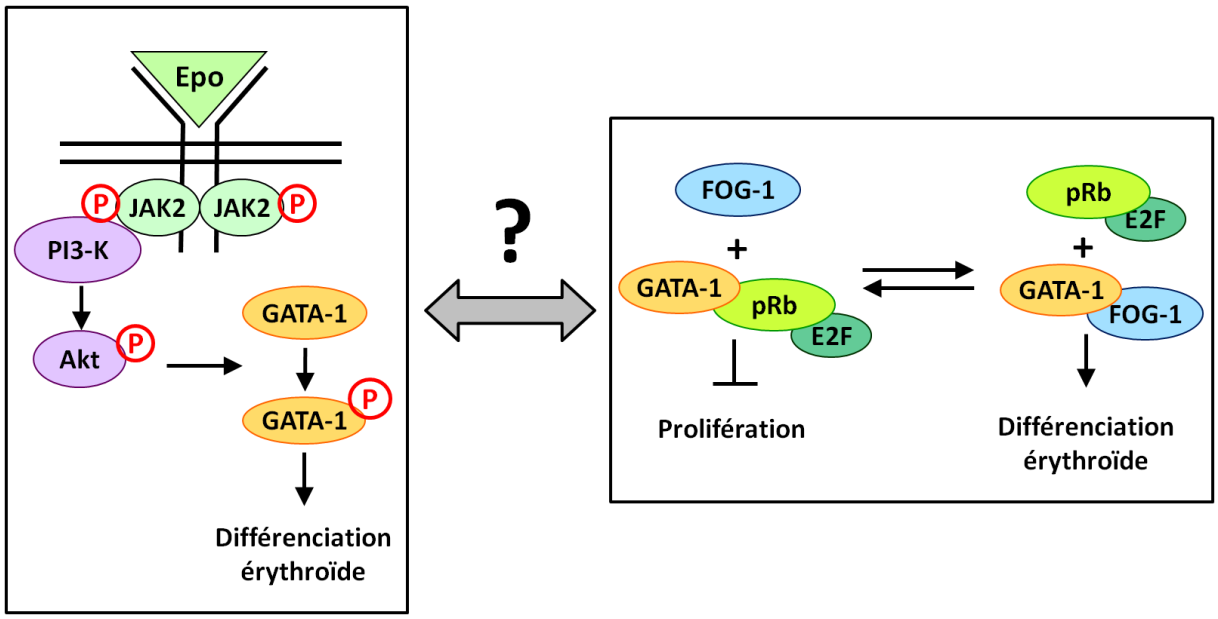
différenciation érythroïde de la lignée G1E. Nous avons alors posé l'hypothèse que l'application de notre modèle moléculaire pourrait restaurer la différenciation érythroïde d'un modèle GATA-1-V205G *in vitro*.

3) Quels sont les mécanismes mis en place *in vivo* permettant de compenser l'absence de phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 ?

Les résultats obtenus dans les parties 1) et 2) laissent supposer que la phosphorylation de GATA-1 par Akt joue un rôle important au cours de l'érythropoïèse terminale. Cependant, les souris exprimant une protéine GATA-1 non phosphorylable (GATA-1^{S310A}) sont viables et ne présentent aucun phénotype évident. L'érythropoïèse terminale de ces souris ne semble pas être perturbée. Il semble donc que la phosphorylation de GATA-1 ne soit pas indispensable *in vivo*. Nous avons alors posé l'hypothèse de l'existence d'un ou plusieurs mécanismes moléculaires permettant de compenser l'absence de phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 *in vivo*. Ainsi, cette dernière partie est consacrée à la recherche de ces éventuels mécanismes.

RESULTATS

I. Rôle de la phosphorylation de GATA-1 par Akt : établissement d'un modèle moléculaire dynamique



Dans cette première partie, nous avons cherché à définir le rôle moléculaire et fonctionnel de la phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 par Akt. Pour pouvoir réaliser une étude biochimique, nous avons tout d'abord validé les conditions expérimentales permettant la visualisation de la phosphorylation de GATA-1 par Akt, et en particulier l'utilisation d'un anticorps spécifique de la Ser310 phosphorylée. Ainsi, nous avons pu étudier le rôle de cette phosphorylation dans les interactions de GATA-1 avec ses partenaires. Enfin, nous nous sommes intéressés au rôle de la phosphorylation dans les fonctions de GATA-1.

1. Validation des conditions expérimentales pour l'étude de la phosphorylation de GATA-1 par Akt

1.1. Validation d'un anticorps spécifique de la Ser310 phosphorylée pour la visualisation directe de la phosphorylation de GATA-1

Jusqu'à présent, le laboratoire utilisait une technique indirecte pour visualiser la phosphorylation de GATA-1 sur la Sérine en position 310. Cette technique consistait à précipiter spécifiquement la protéine GATA-1 et visualiser la phosphorylation à l'aide d'un anticorps dirigé contre les résidus Ser ou Thr phosphorylés au sein de la séquence consensus cible d'Akt (RXRXXS/T où X est un acide aminé quelconque) (Kadri et al., 2005). Cette technique présente cependant certaines limites. Tout d'abord, en raison de la grande variété des cibles cellulaires d'Akt, il faut préalablement purifier la protéine GATA-1, ce qui nécessite de disposer d'une grande quantité de cellules. Il est donc difficile d'étudier la différenciation érythroïde terminale ou de travailler sur des échantillons de patients où le nombre de cellules est limité. Ensuite, il s'agit d'une visualisation indirecte à l'aide d'un anticorps dirigé contre un épitope dégénéré. Cet anticorps n'étant pas spécifique de la protéine GATA-1, les interprétations sont limitées.

Au début de mon travail de thèse, un nouvel anticorps spécifique de la forme phosphorylée de GATA-1 a été commercialisé par la société Santa Cruz. Cet anticorps est décrit comme reconnaissant spécifiquement la séquence d'acides aminés entourant la Sérine 310 phosphorylée de GATA-1 (noté α-GATA-1pS^{310}). La validation de ce nouvel outil s'est effectuée en deux étapes : 1) par l'utilisation d'un modèle cellulaire non érythroïde (NIH-3T3) où nous avons exprimé de façon exogène des formes phosphorylables et non phosphorylables de GATA-1 ; 2) par l'utilisation d'un modèle érythroïde Epo-dépendant (UT-7/Epo) exprimant GATA-1 de manière endogène et dans lequel la phosphorylation de GATA-1 peut être modulée par l'Epo.

1.1.1. Visualisation de la phosphorylation de GATA-1 dans un modèle non érythroïde

La première étape de validation de l'anticorps α-GATA-1pS^{310} était d'établir si son utilisation permettait de discriminer des épitopes phosphorylés et non phosphorylés, et ce dans des conditions dénaturantes et/ou natives. Pour répondre à cette question, l'approche la plus simple était de comparer les signaux obtenus par Western Blot et par immunoprécipitation pour une forme phosphorylable versus une forme non-phosphorylable de GATA-1. Nous avons utilisé une lignée cellulaire non érythroïde, la lignée NIH-3T3, qui n'exprime pas GATA-1 de façon endogène et nous l'avons transduite à l'aide de vecteurs rétroviraux codant ou non (MigR) pour différentes formes de GATA-1 :

- GATA-1-WT pour la protéine sauvage
- GATA-1-S310D où la Sérine 310 n'est pas phosphorylable, mais dont la présence d'un radical acide sur le résidu Aspartate mime une phosphorylation.
- GATA-1-S310A pour une forme non phosphorylable de la protéine où la Sérine 310 est remplacée par une Alanine.

Les résultats sont présentés **Figure 1**.

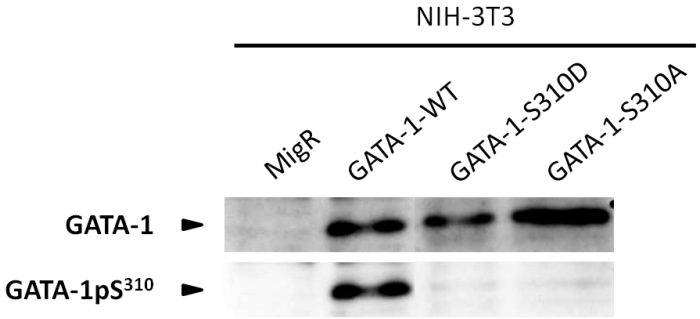


Figure 1 : L'anticorps α-GATA-1pS^{310} permet de discriminer les formes non phosphorylables de la forme sauvage phosphorylée de GATA-1 en conditions dénaturantes
Les cellules NIH-3T3 sont transduites à l'aide de vecteurs rétroviraux codant pour la protéine GATA-1 sauvage (GATA-1-WT), deux formes mutées non phosphorylables par Akt (GATA-1-S310D et GATA-1-S310A) ou avec le vecteur vide (MigR). Les cellules sont lysées, puis la fraction nucléaire (20 µg de protéines) est résolue par Western Blot pour chaque condition de transduction et analysée pour l'expression de la protéine GATA-1 totale (GATA-1) ou la fraction phosphorylée (GATA-1pS^{310}).

Les cellules NIH-3T3 n'exprimant pas la protéine GATA-1, aucun signal n'est détecté dans les cellules MigR. La protéine GATA-1 est observée dans les cellules exprimant la protéine sauvage GATA-1-WT ainsi que les deux formes mutées GATA-1-S310A et GATA-1-S310D. Par contre, la forme phosphorylée sur la Sérine 310 est détectée par l'anticorps α-GATA-1pS^{310} dans les cellules exprimant la protéine sauvage mais pas dans celles exprimant les formes non phosphorylables. Comme ces mutations suppriment le site de phosphorylation, les protéines mutantes ne peuvent pas être phosphorylées par Akt. **Nous avons donc montré que l'anticorps α-GATA-1pS^{310} permet de**

discriminer les formes non phosphorylables de GATA-1 de la forme sauvage phosphorylée en conditions dénaturantes.

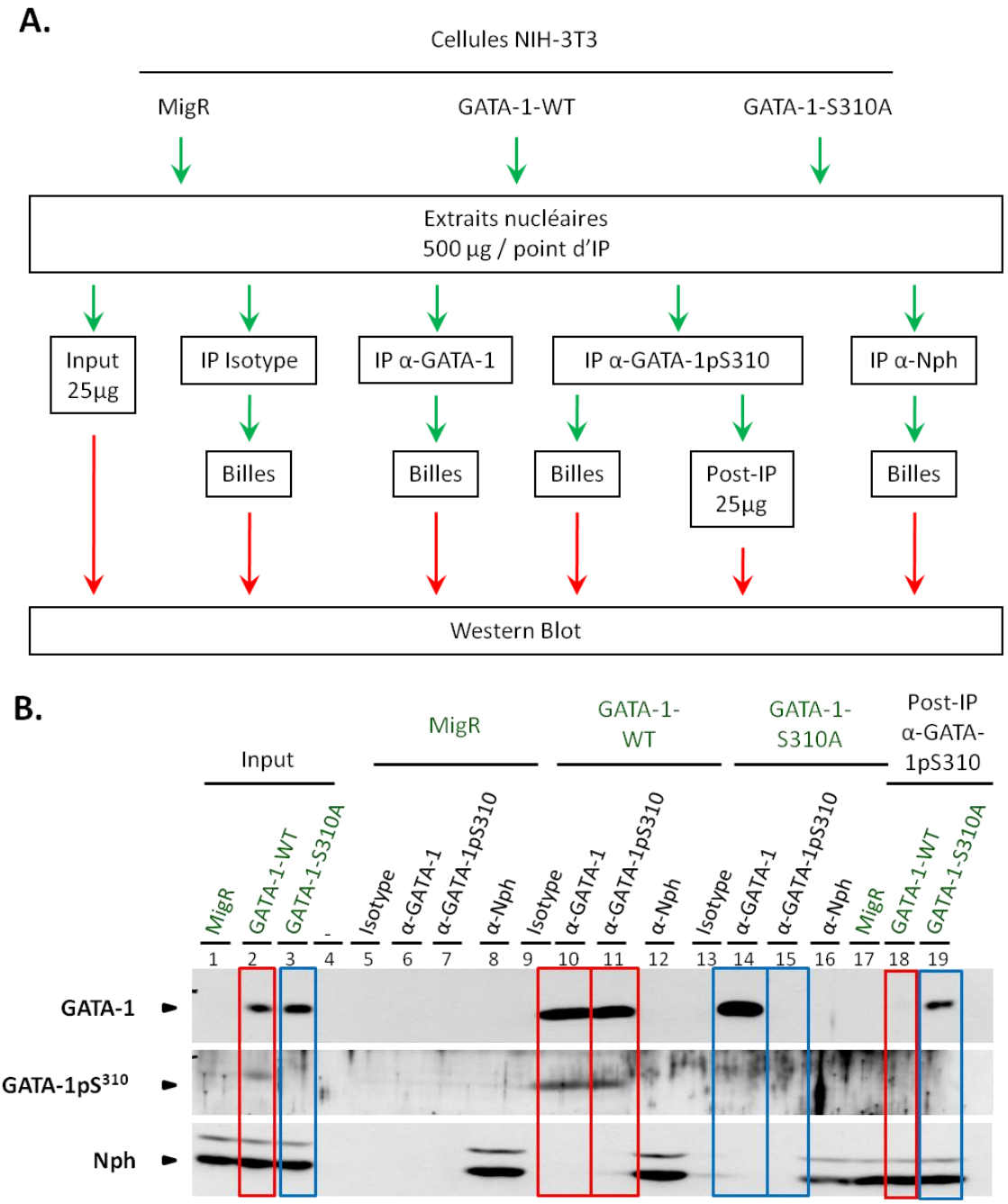


Figure 2 : <u>L'anticorps α-GATA-1pS^{310} permet de discriminer la forme non phosphorylable de la forme sauvage phosphorylée de GATA-1 en conditions natives</u>

A. Les extraits nucléaires des cellules transduites à l'aide des vecteurs vide (MigR), codant pour la protéine GATA-1 sauvage (GATA-1-WT) ou la protéine mutée GATA-1-S310A sont incubés avec des IgG (Isotype) ou avec différents anticorps dirigés contre la protéine GATA-1 phosphorylée (α-GATA-1pS^{310}), la protéine GATA-1 totale (α-GATA-1) ou la nucléophosmine (α-Nph : contrôle d'IP). Les extraits avant IP (Input 25µg), les protéines précipitées (Billes) ainsi que le surnageant de l'IP α-GATA-1pS^{310} (Post-IP 25µg) sont analysés en Western Blot. **B.** Les membranes obtenues sont révélées à l'aide des anticorps α-GATA-1, α-GATA-1pS^{310} et α-Nph. Les différents types de cellules transduites sont indiqués en vert. Les protéines présentes dans les extraits GATA-1-WT sont identifiées par des rectangles rouges, celles présentes dans les extraits GATA-1-S310A par des rectangles bleus.

Pour étudier la spécificité de l'anticorps sur protéines natives, nous avons effectué une immunoprécipitation (IP) sur des lysats nucléaires de cellules NIH-3T3-MigR, -GATA-1-WT et GATA-1-S310A. Pour chaque condition de transduction, quatre immunoprécipitations ont été réalisées : une IP contrôle (Isotype), une IP de GATA-1 totale (α-GATA-1), une IP de GATA-1 phosphorylée (α-GATA-1pS^{310}) et une IP de la nucléophosmine (α-Nph), protéine nucléaire servant de contrôle positif. Les extraits nucléaires avant IP (Input), les produits d'IP obtenus dans chaque condition (Billes), ainsi que les surnageants restant après l'IP α-GATA-1pS^{310} (Post-IP), ont été analysés par Western Blot. Les résultats sont présentés **Figure 2**.

Les cellules MigR n'exprimant pas la protéine GATA-1, aucun signal GATA-1 n'est détecté (pistes 1, 5-8). Comme précédemment, avant IP, GATA-1 est révélé par les anticorps α-GATA-1 et α-GATA-1pS^{310} pour les cellules GATA-1-WT (2), mais uniquement par l'anticorps α-GATA-1 pour les cellules GATA-1-S310A (3).

Les résultats d'IP sur les cellules GATA-1-WT (rectangles rouges) montrent que l'on détecte la protéine totale (GATA-1) et phosphorylée (GATA-1pS^{310}) dans les produits des IP α-GATA-1 (10) et α-GATA-1pS^{310} (11). Après IP α-GATA-1pS^{310}, on ne retrouve pas de signal GATA-1 (18), ce qui indique que la totalité des protéines GATA-1 exprimées dans les NIH-3T3 est phosphorylée et a été précipitée efficacement. Pour les extraits GATA-1-S310A (rectangles bleus), l'anticorps α-GATA-1 précipite la protéine qui est alors reconnue uniquement par l'anticorps α-GATA-1 (14). L'anticorps α-GATA-1pS^{310} ne précipite aucune protéine GATA-1 (15), et on retrouve bien la protéine GATA-1 non phosphorylée dans le surnageant après IP α-GATA-1pS^{310} (19). **L'anticorps α-GATA-1pS^{310} permet donc de discriminer la forme non phosphorylable de GATA-1 de la forme sauvage phosphorylée en conditions natives.**

L'ensemble de ces résultats indique que l'anticorps α-GATA-1pS^{310} est capable de discriminer la forme phosphorylée de GATA-1 lorsque le niveau basal (négatif) est donné par une forme non-phosphorylable. Cette reconnaissance est possible en conditions dénaturantes (Western Blot) ou natives (IP).

1.1.2. Visualisation de la phosphorylation endogène de GATA-1 dans un modèle érythroïde

Jusqu'ici, nous avons montré que l'anticorps α-GATA-1pS^{310} pouvait détecter en Western Blot et en immunoprécipitation la forme sauvage de GATA-1 mais pas les formes mutées sur le site de phosphorylation. L'anticorps α-GATA-1pS^{310} est-il capable de différencier le même épitope sous sa forme phosphorylée et non phosphorylée ? Pour répondre à cette question, nous avons utilisé la

lignée érythro-leucémique humaine UT-7/Epo. Afin de créer des conditions où la phosphorylation de GATA-1 est modulée, nous nous sommes placés d'une part dans des conditions de déprivation où la signalisation cellulaire est éteinte, ce qui nous permet de définir un taux basal de détection, et d'autre part dans des conditions de stimulation où la signalisation est fortement activée et où l'on devrait donc observer une phosphorylation.

Pour cela, les cellules UT-7/Epo subissent tout d'abord une mise au repos qui permet d'éteindre les voies de signalisation. Durant cette étape, les cellules sont privées de facteurs de croissance : elles multiplient alors le nombre d'Epo-R à leur surface de manière à augmenter leur seuil de détection de l'Epo (Hermine et al., 1992). Suite à cette déprivation, les cellules sont stimulées (+) ou non (-) par 10U/mL d'Epo afin d'activer fortement les voies de signalisation cellulaire Epo-dépendantes. Pour éteindre spécifiquement la voie PI3K/Akt et définir au mieux le niveau basal, nous avons également utilisé le LY294002, un inhibiteur spécifique de la PI3K. Après lyse des cellules, les fractions cytoplasmiques (C) et nucléaires (N) sont analysées par Western Blot (**Figure 3A**). Pour normaliser les signaux de phosphorylation, les signaux GATA-1pS^{310} et GATA-1 sont quantifiés (logiciel ImageJ) et le ratio des deux est calculé (**Figure 3B**).

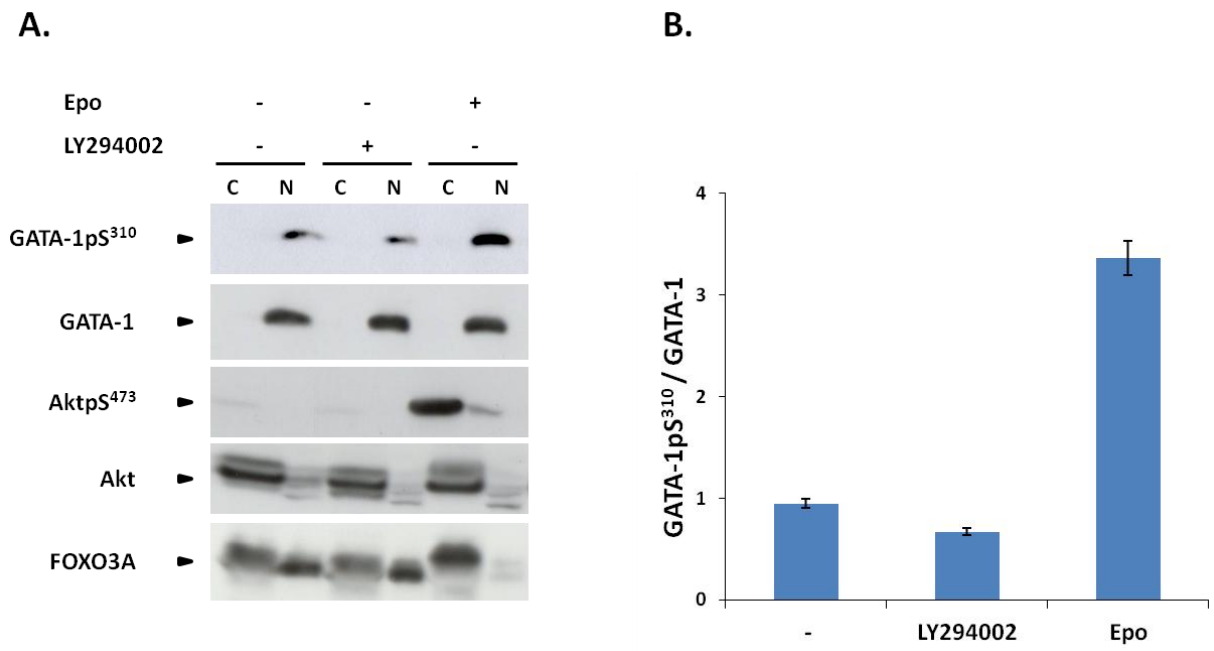


Figure 3 : <u>L'anticorps α-GATA-1pS^{310} est capable de discriminer les formes phosphorylée et non phosphorylée de la protéine GATA-1 endogène</u>

A. Les cellules UT-7/Epo sont privées de facteurs de croissance pendant 16h, puis incubées (+) ou non (-) 30 min avec du LY294002, un inhibiteur de la PI3K, et stimulées (+) ou non (-) 10 min avec 10U/mL d'Epo. Les fractions cytoplasmiques (C) et nucléaires (N) sont analysées par Western Blot pour la présence et l'état de phosphorylation des protéines GATA-1, Akt et FOXO3A. **B.** La quantité de GATA-1pS^{310} détectée est quantifiée et rapportée à la quantité de GATA-1 totale pour chaque condition (déprivées (-), incubées avec le LY294002 et stimulées par l'Epo). Les résultats sont la moyenne (+/- SEM) de trois expériences indépendantes.

Les résultats obtenus par Western Blot montrent que la protéine GATA-1 se trouve exclusivement dans la fraction nucléaire et est en quantité équivalente dans les trois conditions de culture. En ce qui concerne l'état de phosphorylation de GATA-1, le signal GATA-1pS^{310} est plus important dans les conditions de stimulation par l'Epo comparativement au niveau basal représenté ici par les conditions non stimulées (-) avec ou sans inhibiteur de la voie PI3K (LY294002). Le ratio signal GATA-1pS^{310}/signal GATA-1 confirme ce résultat (**Figure 3B**) : en condition de stimulation (Epo), on détecte une phosphorylation plus de trois fois supérieure à celle détectée quand la signalisation est éteinte (- et LY294002).

La sérine 310 de GATA-1 étant la cible d'Akt, nous avons estimé l'état d'activation d'Akt en évaluant son état de phosphorylation sur la Ser473 dans les différentes conditions (**Figure 3A**). Tout d'abord, nous pouvons constater que la même quantité de protéine Akt est présente dans toutes les fractions cytoplasmiques. Par contre, la forme phosphorylée n'est détectée qu'en condition de stimulation Epo. Ce résultat est cohérent avec les données bibliographiques sur la signalisation Epo (Bouscary et al., 2003). Nous avons également estimé l'état d'activation d'une autre cible d'Akt, le facteur de transcription FOXO3A, en examinant sa localisation subcellulaire. En effet, FOXO3A est une protéine majoritairement nucléaire sous forme non phosphorylée, mais sa phosphorylation par Akt activé par l'Epo entraîne sa relocalisation dans le cytoplasme (Biggs et al., 1999). Les résultats obtenus coïncident avec ces données puisqu'en condition de déprivation, on retrouve FOXO3A principalement nucléaire, avec seulement une faible quantité dans la fraction cytoplasmique, tandis qu'en condition de stimulation, la totalité de la protéine est cytoplasmique donc phosphorylée. On remarque d'ailleurs une migration différentielle reflétant l'état de phosphorylation de la protéine en réponse à l'Epo.

L'ensemble de ces résultats montre que, dans nos conditions de culture, nous pouvons éteindre ou activer la signalisation cellulaire Epo-dépendante selon des conditions de déprivation, d'inhibition par le LY294002, ou de stimulation par l'Epo. Dans ces conditions, l'anticorps α-GATA-1pS^{310} est capable de discriminer les formes phosphorylée et non phosphorylée de GATA-1.

Toutefois, nous pouvons nous interroger sur la nature du signal basal GATA-1pS^{310} observé en condition de déprivation (-) et d'inhibition de la PI3K (LY294002). Ce signal n'était pas observé dans le modèle non érythroïde exprimant les protéines GATA-1-S310A et GATA-1-S310D mutées sur le site de phosphorylation. Il aurait pu s'agir d'une phosphorylation résiduelle de GATA-1, mais nous avons vu que la kinase Akt n'est pas activée dans ces conditions. Nous pouvons alors supposer qu'il s'agit d'un signal aspécifique : si l'anticorps α-GATA-1pS310 ne reconnaît pas les épitopes où la Ser310 est mutée (S310A et S310D voir **Figure 1**), il semble reconnaître faiblement l'épitope sauvage non phosphorylé en conditions dénaturantes. La forte augmentation du signal observée en conditions de stimulation permet cependant de discriminer la forme phosphorylée de GATA-1.

A cette étape de l'étude, nous avons validé l'utilisation de l'anticorps α-GATA-1pS^{310} pour détecter efficacement la phosphorylation de GATA-1 dans un modèle érythroïde.

1.2. Détermination des conditions optimales pour l'étude de la phosphorylation Epo-dépendante de GATA-1

Nous avons montré que nous pouvions discriminer les formes phosphorylées et non phosphorylées de GATA-1 à l'aide de l'anticorps α-GATA-1pS^{310}. Si le niveau basal de détection a été clairement établi en condition de déprivation, nous ne savons pas si nous sommes dans des conditions optimales de stimulation. Les conditions de dose et de temps de stimulation utilisées pour la mise au point de l'anticorps (10U/mL d'Epo, 10 min.) étaient inspirées des études classiques de signalisation par l'Epo dans les cellules UT-7/Epo (Bouscary et al., 2003). Ces conditions sont optimales pour étudier l'activation de la kinase Akt, mais quelles sont les valeurs optimales spécifiques à la visualisation de la phosphorylation de GATA-1 ?

Pour répondre à cette question, nous avons déterminé les conditions de stimulation pour lesquelles on détecte une phosphorylation de GATA-1 maximale. Pour cela, nous avons analysé la phosphorylation de GATA-1, tout d'abord en fonction de la concentration d'Epo administrée puis en fonction de la durée de stimulation.

1.2.1. Détermination de la dose optimale d'Epo pour l'étude de la phosphorylation Epo-dépendante de GATA-1

Les cellules UT-7/Epo sont déprivées puis stimulées par différentes doses d'Epo allant de 0 à 10U/mL durant 10 min. Comme précédemment, les fractions cytoplasmiques (C) et nucléaires (N) sont analysées par Western Blot (**Figure 4**).

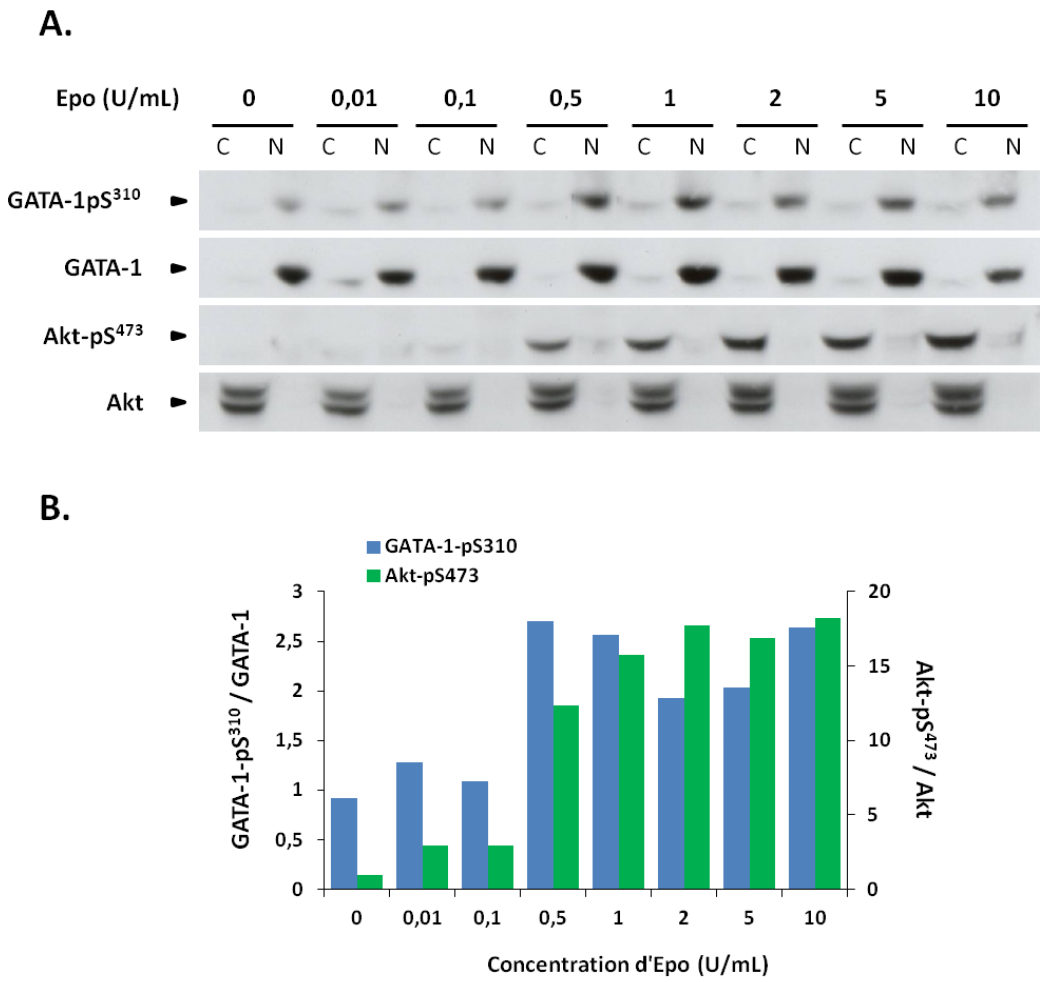


Figure 4 : <u>Détermination de la dose optimale d'Epo pour l'étude de la phosphorylation de GATA-1 Epo-dépendante</u>
A. Les cellules UT-7/Epo sont mises au repos pendant 16h puis stimulées avec différentes concentrations d'Epo (0 à 10U/mL) pendant 10 min. Après lyse, les fractions cytoplasmiques (C) et nucléaires (N) sont analysées par Western Blot. **B.** Les quantités de GATA-1pS^{310} et Akt-pS^{473} sont quantifiées et rapportées à la quantité de GATA-1 totale et Akt totale respectivement.

La quantité de protéine GATA-1 totale est relativement équivalente pour toutes les conditions de stimulation. Par contre, la phosphorylation varie en fonction de la quantité d'Epo administrée. En effet, pour des concentrations d'Epo de 0 à 0,1U/mL, on observe un taux basal de signal GATA-1pS^{310}. Une phosphorylation plus importante est détectée avec des concentrations allant de 0,5 à 10 U/mL. Si on regarde l'état de phosphorylation d'Akt, on observe un effet identique : le signal est obtenu à partir de 0,5U/mL d'Epo. Il est maximal à 10U/mL d'Epo.

L'étude de la phosphorylation de GATA-1 devra donc s'effectuer après stimulation des cellules avec des concentrations d'Epo comprises entre 0,5 et 10 U/mL.

1.2.2. Détermination de la durée de stimulation optimale pour l'étude de la phosphorylation Epo-dépendante de GATA-1

Les cellules UT-7/Epo sont mises au repos dans du milieu de déprivation pendant 16h puis stimulées par 10U/mL d'Epo. La réaction est arrêtée après différents temps de stimulation allant de 0 à 4h. Les fractions cytoplasmiques et nucléaires sont alors analysées en Western Blot (**Figure 5**).

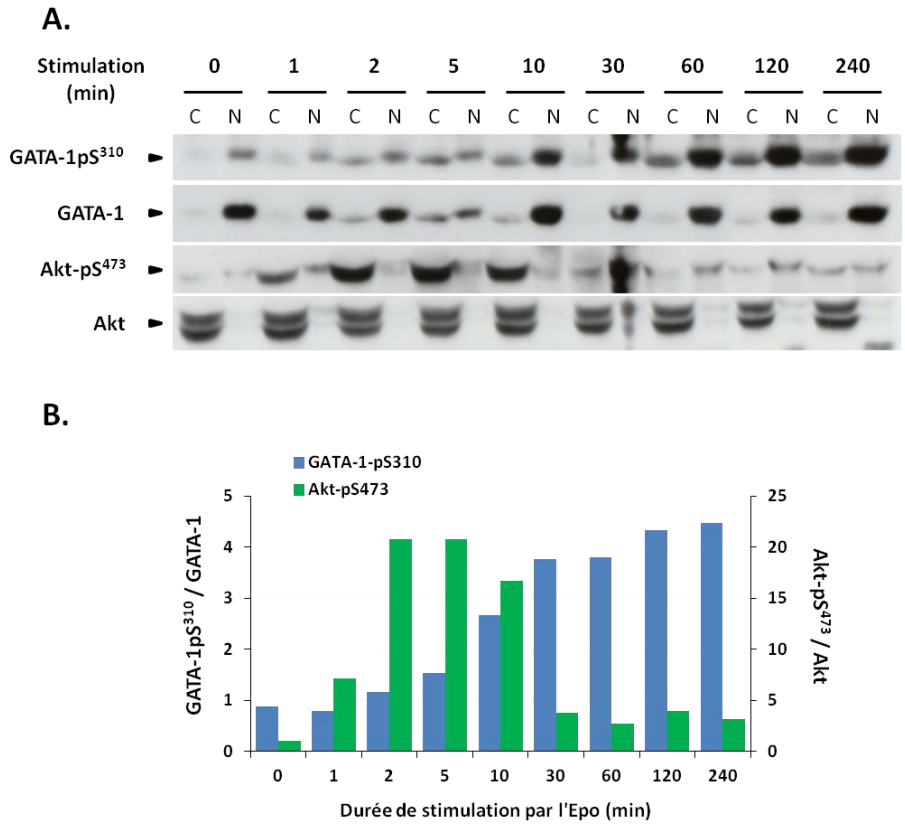


Figure 5 : Détermination de la durée de stimulation optimale pour l'étude de la phosphorylation de GATA-1 Epo-dépendante
A. Les cellules UT-7/Epo sont mises au repos pendant 16h puis stimulées avec 10U/mL d'Epo pendant différents temps (0 à 240 min). Après lyse, les fractions cytoplasmiques (C) et nucléaires (N) sont analysées par Western Blot. **B.** Les quantités de GATA-1pS^{310} et Akt-pS^{473} sont quantifiées et rapportées à la quantité de GATA-1 totale et d'Akt totale respectivement.

Dès la première minute de stimulation, on observe un signal Akt-pS^{473}. L'activation d'Akt est maximale pour une durée de stimulation comprise entre 2 et 10 minutes. On observe cependant une extinction rapide du signal : au-delà de 10 minutes de stimulation, la phosphorylation d'Akt revient à un niveau basal. En revanche, pour une stimulation de 0 à 5 minutes, on observe un taux basal de signal GATA-1pS^{310}. Puis à partir de 10 minutes de stimulation, la phosphorylation de GATA-1 devient visible et perdure jusqu'à 4h de stimulation (240 min).

Pour étudier la protéine GATA-1 phosphorylée en réponse à l'Epo, nous nous placerons à une durée de stimulation comprise entre 10 minutes et 4h.

En conclusion, les conditions optimales définies pour étudier l'activation d'Akt permettent également la visualisation optimale de la phosphorylation Epo-dépendante de GATA-1. Pour la suite de l'étude, les cellules UT-7/Epo seront stimulées par 10U/mL d'Epo pendant 10 minutes.

2. Quel est le rôle de la phosphorylation dans les interactions de GATA-1 avec ses partenaires FOG-1 et pRb ?

Deux études, dont une du laboratoire, ont montré que la phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 semblait avoir un effet sur la différenciation érythroïde (Kadri et al., 2005; Zhao et al., 2006). Cependant, elle ne semble pas avoir d'influence sur la stabilité de la protéine ni sur sa liaison à l'ADN. Nous avons alors posé l'hypothèse que la phosphorylation jouerait un rôle dans l'interaction de GATA-1 avec ses partenaires. Le laboratoire étudie actuellement les interactions de GATA-1 avec deux de ses partenaires : FOG-1 et pRb. L'interaction GATA-1/FOG-1 est essentielle à la mise en place du phénotype érythroïde et en particulier à la transcription de nombreux gènes érythroïdes. Nous avons alors choisi d'étudier l'effet de la phosphorylation de GATA-1 sur l'interaction GATA-1/FOG-1.

Pour cela, nous avons utilisé dans un premier temps la co-immunoprécipitation. En effet, les outils nécessaires à cette technique ont été mis au point dans le chapitre précédent. De plus, cette technique peut être utilisée dans des modèles cellulaires exprimant les protéines d'intérêt de manière endogène et où la phosphorylation de GATA-1 peut être modulée. Dans un second temps, nous avons étudié l'interaction GATA-1/FOG-1 par la technique du double hybride chez la levure. Historiquement, c'est par cette technique que la protéine FOG-1 a été identifiée comme partenaire de GATA-1 (Tsang et al., 1997). C'est d'ailleurs de là qu'elle tire son nom. Nous avons alors choisi d'utiliser cette méthode pour notre étude.

2.1. Etude du rôle de la phosphorylation de GATA-1 dans l'interaction GATA-1/FOG-1 par co-immunoprécipitation

Afin d'évaluer l'effet de la phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 sur l'interaction avec son cofacteur FOG-1, nous avons d'une part modulé la phosphorylation endogène de GATA-1 dans une lignée érythro-leucémique (UT-7/Epo) et d'autre part exprimé de manière exogène des protéines GATA-1 mutées sur la Ser310 dans une lignée non érythroïde (NIH-3T3). Dans les deux cas, l'interaction GATA-1/FOG-1 a été analysée par co-immunoprécipitation.

2.1.1. Modulation de la phosphorylation endogène de GATA-1 – lignée UT-7/Epo

Dans le chapitre précédent, nous avons défini les conditions optimales de visualisation de la phosphorylation de GATA-1 dans les cellules UT-7/Epo en réponse à l'Epo. Nous avons également montré que l'anticorps α-GATA-1pS^{310} pouvait être utilisé en IP. Pour évaluer le rôle de la phosphorylation de GATA-1 dans l'interaction avec FOG-1, nous avons alors modulé l'état de phosphorylation de GATA-1 et testé les interactions GATA-1/FOG-1 par IP sur des lysats nucléaires de cellules UT-7/Epo. Les résultats sont présenté **Figure 6**.

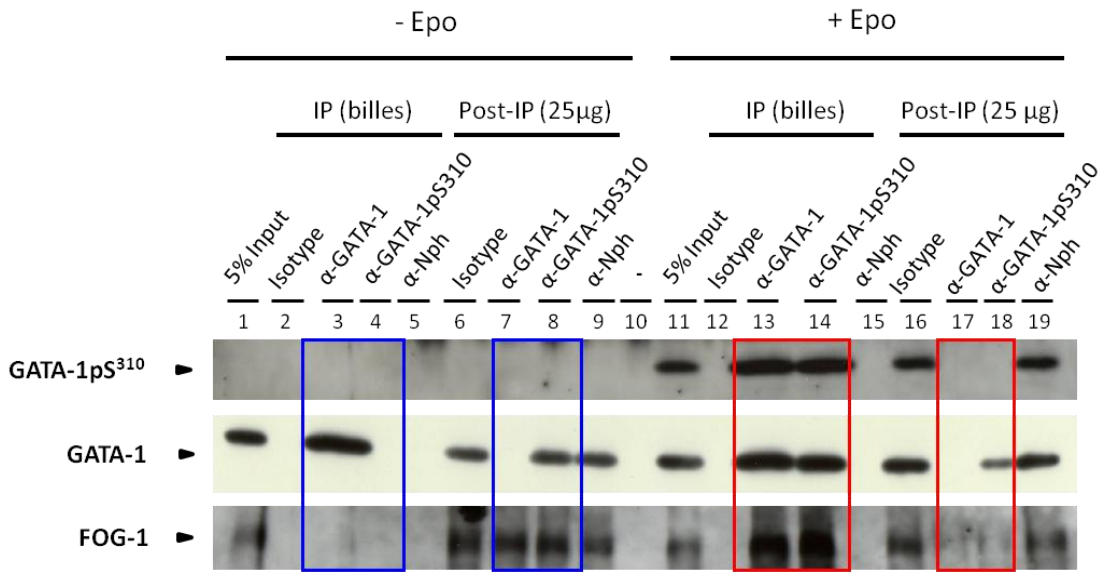


Figure 6 : FOG-1 interagit uniquement avec la forme phosphorylée de la protéine GATA-1 endogène
Une immunoprécipitation de la protéine GATA-1 totale (α-GATA-1) et de la forme phosphorylée (α-GATA-1pS^{310}) a été réalisée à partir de 500 µg d'extraits nucléaires de cellules UT-7/Epo déprivées puis stimulées (+Epo) ou non (-Epo) par 10U/mL d'Epo. Deux contrôles d'IP (isotype et Nph) sont inclus. Les protéines avant IP (5% input : 25µg), immunoprécipitées (IP) ou non précipitées (post-IP équivalent à 25µg de protéines) sont analysées par Western Blot. En condition de déprivation (-Epo), la protéine GATA-1 n'est pas phosphorylée et ne précipite pas FOG-1 (rectangles bleus). En condition de stimulation (+Epo), la protéine GATA-1 est phosphorylée (signal GATA-1pS^{310}) et précipite FOG-1 (rectangles rouges).

Dans les extraits non stimulés (-Epo), on ne détecte aucun signal α-GATA-1pS^{310} (pistes 1-9) et aucune protéine n'a été précipitée par cet anticorps (4). La protéine GATA-1 est retrouvée uniquement dans le surnageant post-IP α-GATA-1pS^{310} (8). Ce résultat indique que la phosphorylation de GATA-1 est entièrement éteinte. Dans ces conditions, on remarque que la protéine FOG-1 n'est révélée que dans les surnageants post-IP (6-9) : aucune protéine FOG-1 n'a été co-précipitée avec GATA-1 (3,4) (rectangles bleus).

Dans les extraits stimulés (+Epo), la forme phosphorylée de GATA-1 est révélée dans l'IP α-GATA-1pS^{310} (14) mais pas dans le surnageant post-IP correspondant (18) : la totalité des protéines phosphorylées ont été précipitées. Cependant, on détecte un léger signal GATA-1 dans le surnageant post-IP α-GATA-1pS^{310} (18), ce qui indique qu'il reste une fraction de GATA-1 non phosphorylée. En

ce qui concerne la protéine FOG-1, on la retrouve en totalité dans les IP α-GATA-1 (13) et α-GATA-1pS^{310} (14) (rectangles rouges).

L'ensemble de ces résultats indique qu'en conditions non stimulées, FOG-1 ne co-précipite pas avec GATA-1. Par contre, en conditions de stimulation, la majorité de GATA-1 est phosphorylée, et elle co-précipite la totalité de FOG-1. Nous pouvons donc conclure que FOG-1 interagit uniquement avec la forme phosphorylée de GATA-1.

2.1.2. Expression exogène de protéines GATA-1 mutées sur la Ser310 – lignée NIH-3T3

Nous avons testé l'effet de la phosphorylation sur l'interaction GATA-1/FOG-1 dans un modèle non érythroïde à l'aide des protéines GATA-1 mutées sur la Ser310. Nous avons alors exprimé, par transduction dans les cellules NIH-3T3, les différentes formes de GATA-1 : sauvage (WT), non phosphorylable (S310A) et mimant une phosphorylation constitutive (S310D). Ces cellules ont ensuite été transfectées ou non par FOG-1. Puis, nous avons analysé l'interaction GATA-1/FOG-1 par co-immunoprécipitation. Les résultats sont présentés **Figure 7**.

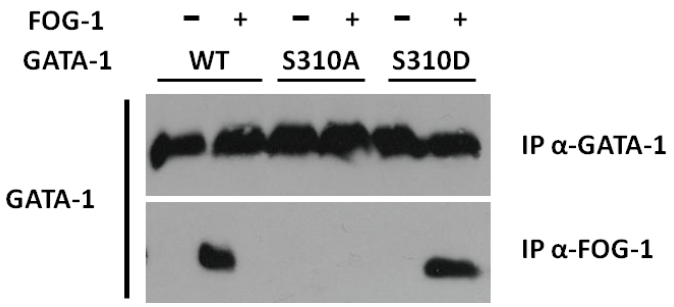


Figure 7 : FOG-1 interagit uniquement avec les formes sauvage (WT) et mimant une phosphorylation constitutive (S310D) de GATA-1 dans un modèle reconstitué
Les cellules NIH-3T3 ont été transduites par des vecteurs rétroviraux codant pour GATA-1-WT, GATA-1-S310A, GATA-1-S310D. Elles ont ensuite été transfectées ou non par un vecteur codant pour FOG-1. Après lyse des cellules, des co-immunoprécipitations α-GATA-1 et α-FOG-1 sont réalisées sur les fractions nucléaires puis analysées par Western Blot.

Les résultats de l'IP α-GATA-1 montrent que les protéines GATA-1-WT, -S310A et -S310D sont exprimées de manière équivalente dans toutes les conditions.

L'IP α-FOG-1 montre que les protéines GATA-1-WT et -S310D sont co-précipitées avec FOG-1. En revanche, on ne détecte aucun signal dans les extraits des cellules exprimant GATA-1-S310A, cette protéine n'est donc pas précipitée par l'IP α-FOG-1.

Ces résultats indiquent que la protéine FOG-1 interagit avec la forme sauvage GATA-1-WT et la forme GATA-1-S310D qui mime une phosphorylation constitutive de la protéine. Par contre, elle ne semble pas interagir avec la forme non phosphorylable GATA-1-S310A. Cela confirme les résultats

obtenus précédemment dans les UT-7/Epo stimulées : FOG-1 interagit uniquement avec la forme phosphorylée de GATA-1.

2.2. Etude du rôle de la phosphorylation de GATA-1 dans l'interaction GATA-1/FOG-1 par la technique du double hybride chez la levure

Les résultats obtenus jusqu'à présent en IP dans des modèles érythroïde avec une phosphorylation endogène, et non érythroïde avec l'expression de mutants du site de phosphorylation, ont montré que FOG-1 interagit uniquement avec la forme phosphorylée sur la Ser310 de GATA-1. Nous pouvons alors supposer que la phosphorylation de GATA-1 est nécessaire à l'interaction GATA-1/FOG-1. Nous avons alors souhaité confirmer cette théorie par une méthode différente.

Une autre technique permettant de détecter une interaction protéique est la technique du double hybride chez la levure. Elle consiste à reconstituer, par l'intermédiaire de deux interactants, un facteur de transcription actif qui permet la pousse de la levure en milieu sélectif. Chez la levure, il existe un facteur de transcription appelé Gal4 qui lie une séquence UAS dans le promoteur de ses gènes cibles et active leur transcription. Dans le système double hybride, une protéine X est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de Gal4, noté **LexA**, qui va se lier à la séquence UAS dans le promoteur du gène His3. Par ailleurs, une protéine Y est fusionnée au domaine activateur de Gal4, noté **Gal4AD**, qui permettra l'activation du gène His3. Le gène His3 code pour une enzyme qui catalyse la dernière étape de la biosynthèse de l'Histidine. Si les deux protéines X et Y interagissent entre elles, elles entraîneront le rapprochement des deux domaines de Gal4, LexA et Gal4AD, et permettront la transcription du gène His3 et donc la pousse de la levure sur un milieu sélectif sans Histidine. Si les deux protéines n'interagissent pas, la levure ne poussera pas sur milieu sélectif (**Figure 8**).

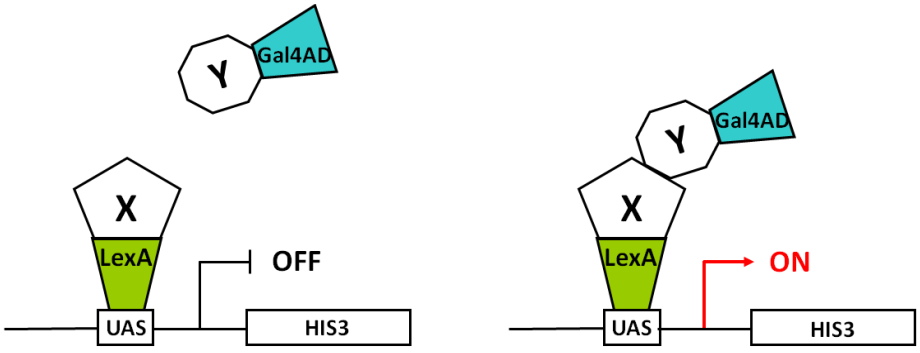


Figure 8 : Principe du double hybride chez la levure
Une protéine X et une protéine Y sont fusionnées respectivement au domaine de liaison à l'ADN LexA et au domaine transactivateur Gal4AD d'un facteur de transcription de levure. Ces protéines de fusion sont ensuite exprimées dans des levures. L'interaction X/Y permet de reconstituer le facteur de transcription et d'activer la transcription du gène HIS3, ce qui permet alors la pousse des levures sur milieu sélectif (sans Histidine).

Le but de notre étude était de tester l'interaction des différents mutants de phosphorylation de GATA-1 avec FOG-1 par cette technique de double hybride chez la levure. Cette analyse a été réalisée par la société Hybrigenics.

Pour commencer, les protéines GATA-1 et FOG-1 ont chacune été fusionnées à LexA d'une part et Gal4AD d'autre part. Chaque construction a été testée seule et en coexpression avec sa construction complémentaire dans les levures (**Figure 9**).

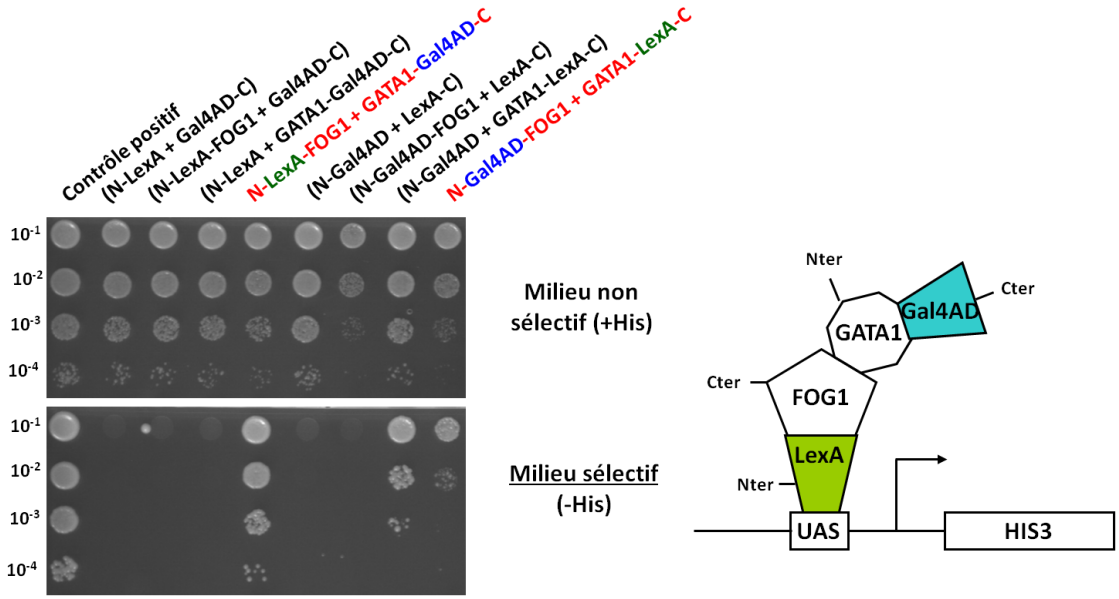


Figure 9 : <u>Mise au point de l'étude de l'interaction GATA-1/FOG-1 par double hybride</u>
Les protéines GATA-1 et FOG-1 ont été fusionnées au domaine LexA d'une part et au domaine Gal4AD d'autre part. Chaque construction a été testée seule et avec sa construction complémentaire. Le modèle choisi pour la suite de l'étude est représenté à droite : **N-LexA-FOG-1 + GATA-1-Gal4AD-C**.

Les deux couples N-LexA-FOG-1 + GATA-1-Gal4AD-C et N-Gal4AD-FOG-1 + GATA-1-LexA-C ont donné des résultats positifs. Cependant, la construction GATA-1-LexA-C exprimée avec le domaine d'activation seul N-Gal4AD donne également un résultat positif. GATA-1-LexA-C seul est capable de transactiver le gène His3. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que GATA-1 étant un facteur de transcription, il possède son propre domaine de transactivation. En revanche, tous les contrôles de la 1e construction sont négatifs. C'est donc celle-ci qui a été utilisée pour la suite de l'étude : **N-LexA-FOG-1 + GATA-1-Gal4AD-C** (**Figure 9**).

Les différentes protéines GATA-1 mutantes ont alors été fusionnées également au domaine activateur Gal4AD. Chacune d'entre elles a été exprimée avec la construction N-LexA-FOG-1 dans les levures qui ont été cultivées sur milieu sélectif (sans Histidine) (**Figure 10**).

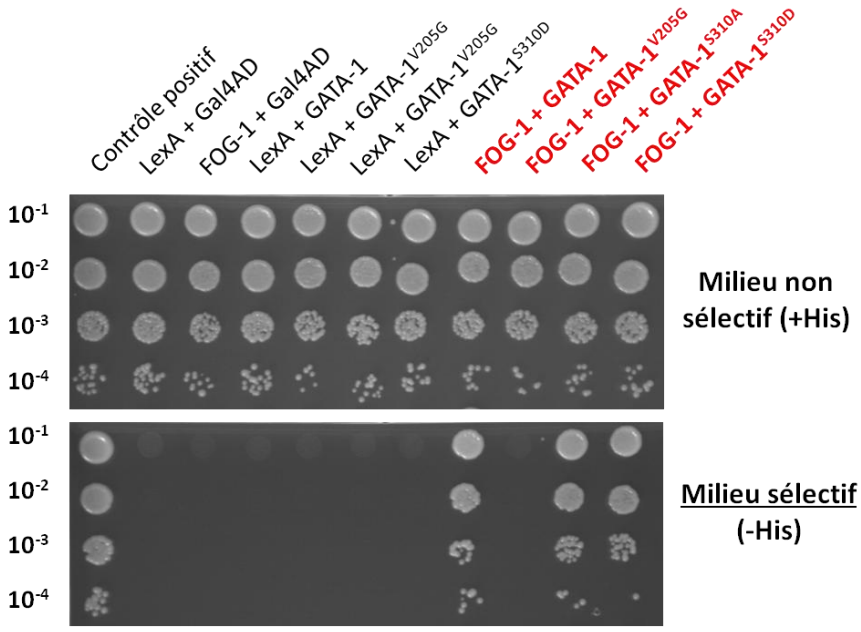


Figure 10 : Etude de l'interaction GATA-1/FOG-1 par la technique du double hybride
La protéine FOG-1 et les différents mutants de GATA-1 sont fusionnés respectivement au domaine de liaison à l'ADN (LexA) et au domaine transactivateur (Gal4AD) du facteur de transcription de levure Gal4. Les protéines GATA-1, GATA-1-V205G, GATA-1-S310A et GATA-1-S310D fusionnées à Gal4AD sont co-exprimées avec la protéine FOG-1 fusionnée à LexA dans les levures. Les levures sont alors mises à pousser sur milieu non sélectif (avec Histidine) ou sur milieu sélectif (sans Histidine).

Comme prévu, les résultats obtenus montrent que la protéine sauvage GATA-1-WT interagit avec FOG-1 et induit la pousse de la levure en milieu sélectif. Nous avons utilisé comme contrôle négatif un mutant de GATA-1, GATA-1-V205G, qui n'interagit pas avec FOG-1 (Crispino et al., 1999). L'expression de GATA-1-V205G et FOG-1 ne permet pas la pousse de la levure, il n'y a donc pas d'interaction entre les deux protéines.

En ce qui concerne les mutants de phosphorylation, on observe une pousse de levure quand GATA-1-S310D et FOG-1 sont exprimés, indiquant une interaction entre les deux protéines. Ceci est cohérent avec les résultats observés précédemment en IP dans les NIH-3T3. Par contre, on observe également une pousse de levure en présence de FOG-1 et GATA-1-S310A. Ce qui signifie qu'il existe une interaction entre FOG-1 et la protéine non phosphorylable GATA-1-S310A.

Ceci est en contradiction avec l'hypothèse formulée précédemment selon laquelle la phosphorylation de GATA-1 serait nécessaire à l'interaction GATA-1/FOG-1. Comment expliquer ces résultats ?

Nous avons alors analysé en Western Blot le contenu protéique des différentes levures et comparé les quantités relatives des protéines GATA-1 et FOG-1 présentes dans les extraits de levures utilisés avec celles présentes dans des cellules exprimant GATA-1 et FOG-1 de manière endogène. Pour cela, nous avons utilisé la lignée érythro-leucémique humaine UT-7/Epo, ainsi que des progéniteurs érythroïdes murins. Les résultats sont présentés **Figure 11**.

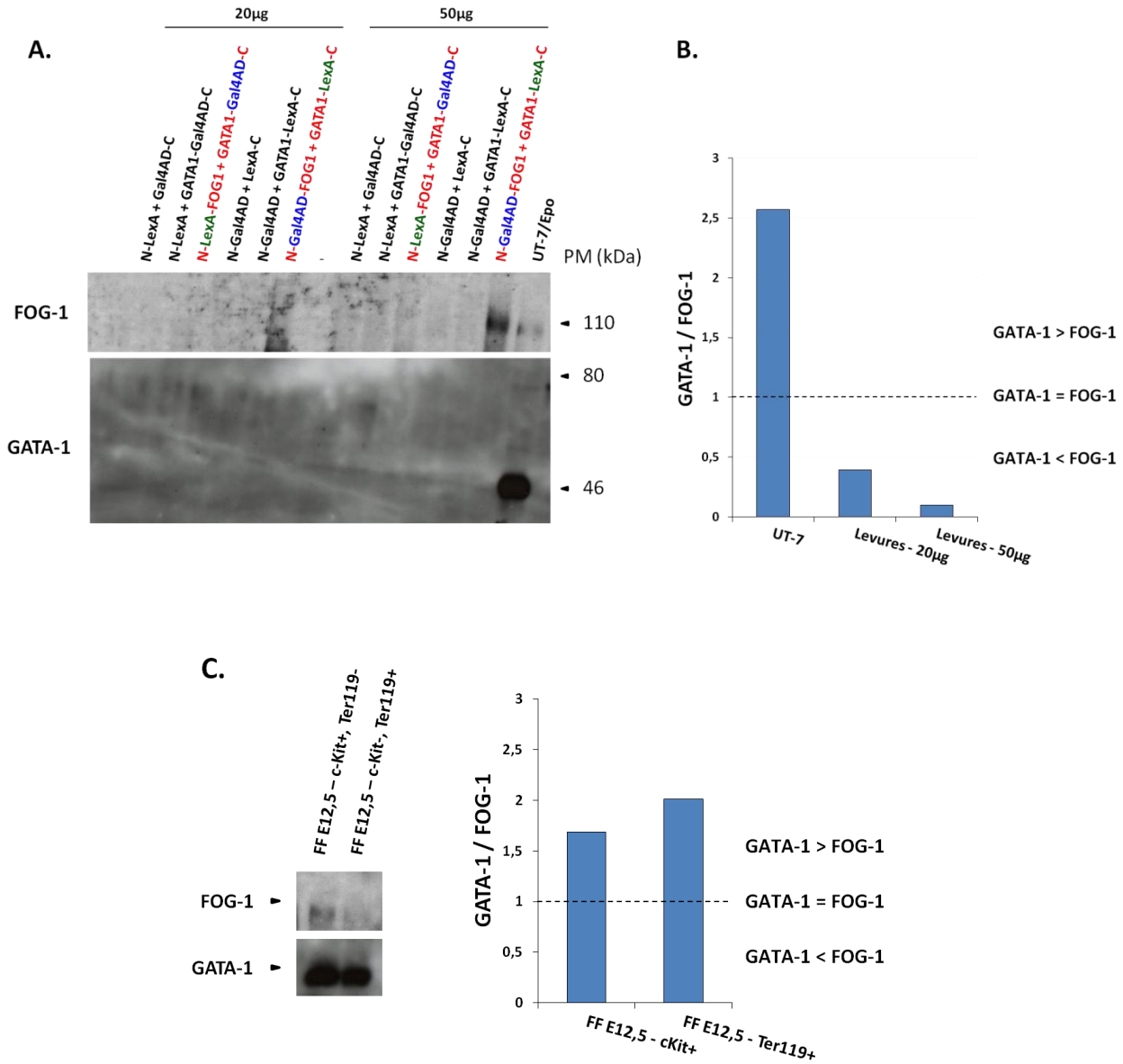


Figure 11 : <u>Le ratio GATA-1/FOG-1 dans les levures est différent des ratios endogènes humain et murin</u>
A. 20µg et 50µg d'extraits nucléaires de levures FOG-1+GATA-1, ainsi que des extraits nucléaires de cellules humaines UT-7/Epo ont été déposés sur gel SDS-PAGE et analysés en Western Blot pour la présence des protéines GATA-1 et FOG-1. Les protéines natives GATA-1 et FOG-1 sont attendues respectivement à 47kDa et 110kDa. Les protéines de fusion ont des poids moléculaires légèrement supérieurs : LexA-FOG-1 (134kDa), Gal4AD-FOG-1 (126kDa), GATA-1-Gal4AD (63kDa) et GATA-1-LexA (71kDa). **B.** Les ratios GATA-1/FOG-1 présents dans la lignée humaine (UT-7) et dans 20µg et 50µg d'extraits de levures exprimant les constructions N-Gal4AD-FOG-1+GATA-1-LexA-C (Levures 20µg et Levures 50µg) sont représentés. **C.** Des extraits de progéniteurs érythroïdes de foie fœtal murin triés sur un marqueur précoce (c-Kit+) ou tardif (Ter119+) ont été déposés sur gel SDS-PAGE et analysés en Western Blot pour la présence des protéines GATA-1 et FOG-1. Le ratio GATA-1/FOG-1 est représenté à droite.

On détecte la protéine GATA-1 en grande quantité, ainsi que la protéine FOG-1 en quantité moins importante dans les extraits des lignées UT-7/Epo. Dans les levures, on détecte la présence de la protéine FOG-1 uniquement dans les extraits contenant les constructions N-Gal4AD-FOG-1 + GATA-1-LexA-C. La protéine GATA-1 n'est détectée dans aucun des extraits. Les films ont été volontairement surexposés mais aucun signal spécifique n'apparaît. Nous pouvons supposer que les extraits déposés

ne contenaient pas une quantité suffisante de protéines GATA-1 et FOG-1 pour qu'elles soient détectées par nos anticorps. Malheureusement, tous les extraits dont nous disposions ont été utilisés dans cette expérience.

Si l'on se base sur les extraits de levures exprimant les constructions N-Gal4AD-FOG-1 + GATA-1-LexA-C, on peut constater que les quantités relatives de protéines GATA-1 et FOG-1 présentes dans les levures sont totalement différentes de celles présentes de manière endogène dans les UT-7/Epo. Comme le montre la **Figure 11B**, le ratio GATA-1/FOG-1 observé dans les UT-7/Epo est supérieur à 1, indiquant que la quantité de GATA-1 est supérieure à celle de FOG-1. Dans les levures en revanche, ce ratio est inférieur à 1. La quantité de GATA-1 est donc inférieure à celle de FOG-1.

Si l'on analyse par ailleurs les quantités de protéines présentes dans des extraits de progéniteurs érythroïdes issus de foie fœtal murin de 12,5 jours de développement (FF E12,5) et triés sur l'expression d'un marqueur précoce (**c-Kit+**, Ter119-) ou tardif (c-Kit-, **Ter119+**), on peut remarquer que, comme dans les cellules humaines UT-7/Epo, le ratio GATA-1/FOG-1 est supérieur à 1 (**Figure 11C**). Ce résultat confirme que, de manière endogène, la protéine GATA-1 est présente en plus grande quantité que FOG-1.

La différence de quantités relatives de protéines observée dans les levures par rapport aux modèles endogènes pourrait alors expliquer la détection d'une interaction GATA-1-S310A/FOG-1 que l'on ne détectait pas auparavant dans notre étude. L'augmentation de la quantité relative de FOG-1 par rapport à GATA-1 permettrait la formation d'un complexe GATA-1-S310A/FOG-1. Dans ce cas, la phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 ne serait alors pas nécessaire à l'interaction GATA-1/FOG-1 mais régulerait simplement son affinité en facilitant sa formation.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'effet de l'augmentation de FOG-1 sur la formation d'un complexe GATA-1-S310A/FOG-1 dans le modèle reconstitué utilisé précédemment (NIH-3T3).

2.3. Quel est l'effet de l'augmentation de la quantité de protéines FOG-1 sur l'interaction GATA-1-S310A/FOG-1 ?

Le laboratoire a montré précédemment que, lors de la différenciation érythroïde, GATA-1 est capable d'interagir avec la protéine pRb, régulateur du cycle cellulaire, pour former un tricomplexe GATA-1/pRb/E2F2 inhibant la prolifération cellulaire. La présence de FOG-1 permet la dissociation du complexe GATA-1/pRb/E2F2 et la formation du complexe GATA-1/FOG-1 (Kadri et al., 2009).

Si, comme nous le supposons, l'augmentation de la quantité de FOG-1 permet l'apparition de complexes GATA-1-S310A/FOG-1, nous devrions également visualiser la disparition des complexes

GATA-1-S310A/pRb. Nous avons alors fait varier les quantités relatives des protéines GATA-1 et FOG-1 dans les cellules NIH-3T3, qui expriment pRb de manière endogène, et étudié l'effet de telles modifications sur les interactions GATA-1-S310A/FOG-1 et GATA-1-S310A/pRb.

Les NIH-3T3, transduites avec la forme sauvage GATA-1-WT ou non phosphorylable GATA-1-S310A, ont été transfectées avec des quantités croissantes de vecteur codant pour la protéine FOG-1. Pour chaque condition, nous avons alors analysé les interactions protéiques GATA-1/FOG-1 et GATA-1/pRb par co-immunoprécipitation sur les extraits nucléaires. Les résultats sont représentés en **Figure 12**.

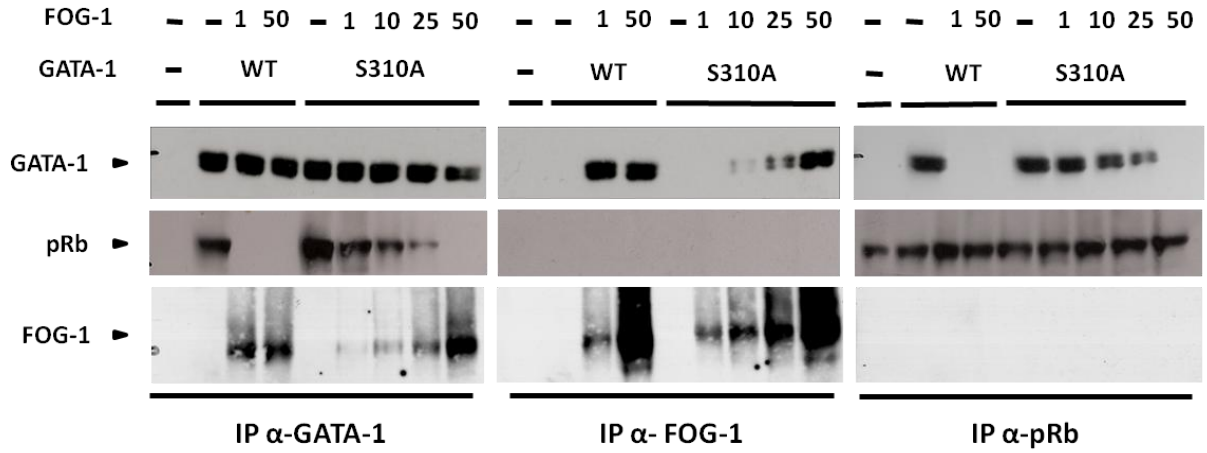


Figure 12 : <u>L'augmentation de la quantité de FOG-1 permet la formation de complexes GATA-1-S310A/FOG-1</u>
Les cellules NIH-3T3 sont transduites ou non (-) par des vecteurs rétroviraux codant pour les protéines GATA-1-WT et GATA-1-S310A. Elles sont ensuite transfectées ou non par différentes quantités de vecteur codant pour la protéine FOG-1 : une quantité 1 correspond à une même quantité de vecteurs FOG-1 et GATA-1 (100ng). Après lyse des cellules, des immunoprécipitations des protéines GATA-1, FOG-1 et pRb sont réalisées sur les extraits nucléaires et analysées par Western Blot.

En absence de FOG-1, GATA-1-WT et GATA-1-S310A interagissent toutes deux avec pRb. L'absence de phosphorylation de GATA-1 n'a donc pas d'effet sur son interaction avec pRb.

La présence de FOG-1 entraîne la dissociation du complexe GATA-1-WT/pRb et la formation du complexe GATA-1-WT/FOG-1. Nous pouvons d'ailleurs remarquer que quelle que soit la quantité relative de FOG-1 par rapport à GATA-1 (1 ou 50) exprimée dans les cellules, la même quantité de FOG-1 est précipitée par l'IP α-GATA-1, et inversement la même quantité de GATA-1 est précipitée par l'IP α-FOG-1. Cela indique que l'interaction GATA-1-WT/FOG-1 est maximale pour une quantité 1 de FOG-1.

La présence d'une quantité 1 de FOG-1 dissocie le complexe GATA-1-WT/pRb mais ne dissocie pas le complexe GATA-1-S310A/pRb. On n'observe alors pas d'interaction GATA-1-S310A/FOG-1. Par contre, l'augmentation de la quantité de FOG-1 permet l'apparition progressive de complexes GATA-1-S310A/FOG-1. Celle-ci est concomitante avec la disparition des complexes GATA-1-S310A/pRb, et

proportionnelle à la quantité de FOG-1 exprimée. Pour une quantité maximale de FOG-1 (50), tous les complexes GATA-1-S310A/pRb ont été dissociés, toutes les protéines GATA-1-S310A interagissent alors avec FOG-1.

Ces résultats indiquent que, même en absence de phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310, la protéine FOG-1, si elle est en quantité suffisante, est capable d'interagir avec GATA-1 en déplaçant le complexe GATA-1/pRb. Ceci permet d'expliquer les résultats obtenus en double hybride et confirme notre hypothèse. Il ne s'agit donc pas d'un mécanisme de type « tout ou rien ». La phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 n'est pas indispensable à la formation du complexe GATA-1/FOG-1. Ceci est d'ailleurs cohérent avec les données des études précédentes où l'absence de phosphorylation de GATA-1 diminuait la différenciation érythroïde mais ne l'abrogeait pas totalement (Kadri et al., 2005; Zhao et al., 2006). Tout comme la phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 n'est pas indispensable à la différenciation érythroïde, il semble qu'elle ne soit pas indispensable à l'interaction GATA-1/FOG-1. Elle semble plutôt jouer un rôle de régulateur, en augmentant l'affinité de GATA-1 pour FOG-1, favorisant ainsi la formation d'un complexe GATA-1/FOG-1 au détriment du complexe GATA-1/pRb.

Nous pouvons alors conclure que la phosphorylation de GATA-1 par Akt sur la Ser310 augmente son affinité pour FOG-1. De ce fait, elle favorise le déplacement de l'équilibre vers la formation du complexe GATA-1 phosphorylé/FOG-1, au détriment du complexe GATA-1/pRb. Cependant, en absence de phosphorylation, l'augmentation de la quantité de FOG-1 permet la formation de complexes GATA-1 non phosphorylée/FOG-1, et ainsi le déplacement de l'équilibre moléculaire (Figure 13).

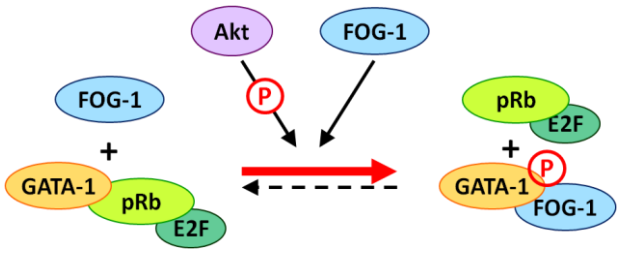


Figure 13 : La phosphorylation de GATA-1 par Akt et l'augmentation de FOG-1 favorisent l'interaction GATA-1/FOG-1 et la dissociation de GATA-1/pRb

Les complexes GATA-1/pRb et GATA-1/FOG-1 ont des fonctions différentes : GATA-1/pRb inhibe la prolifération cellulaire, tandis que GATA-1/FOG-1 est nécessaire à la transcription des gènes érythroïdes. Nous avons montré que la phosphorylation de GATA-1 régule l'équilibre moléculaire de ces complexes. Qu'en est-il des fonctions associées ?

3. Quel est le rôle de la phosphorylation dans la régulation des fonctions de GATA-1 ?

3.1. Quel est l'effet de la phosphorylation sur la régulation de la fonction antiprolifératives du complexe GATA-1/pRb par FOG-1 ?

Le laboratoire a mis en évidence l'interaction de GATA-1 avec la protéine pRb, régulateur du cycle cellulaire, dans un tricomplexe GATA-1/pRb/E2F2 (Kadri et al., 2009). Ce tricomplexe inhibe la prolifération cellulaire. La présence de FOG-1 entraîne la dissociation de GATA-1/pRb/E2F2, permettant ainsi la formation du complexe GATA-1/FOG-1 et la reprise de la prolifération cellulaire. Nous avons montré dans le chapitre précédent que la phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 favorise la formation du complexe GATA-1/FOG-1. Quelle est la conséquence de ce phénomène sur la prolifération cellulaire ? Nous avons alors étudié l'effet de la phosphorylation sur la reprise de la prolifération cellulaire induite par FOG-1.

Pour cela, des cellules NIH-3T3 ont été transduites par des vecteurs codant pour les différentes formes de GATA-1 (WT, S310A et S310D) ou le vecteur vide (MigR), puis transfectées ou non par un vecteur codant pour la protéine FOG-1. La prolifération cellulaire a ensuite été mesurée par fluorescence. Les résultats sont présentés **Figure 14**.

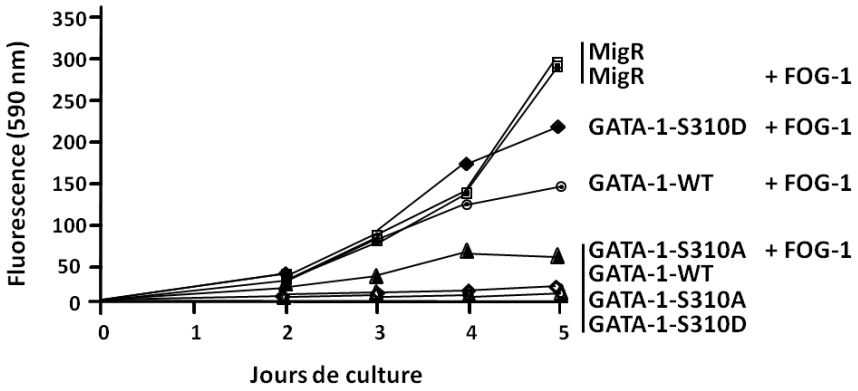


Figure 14 : La phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 permet la levée par FOG-1 de l'inhibition de prolifération induite par GATA-1

Les cellules NIH-3T3 sont transduites par des vecteurs rétroviraux codant pour GATA-1-WT, GATA-1-S310A, GATA-1-S310D ou le vecteur vide MigR. Ces mêmes cellules sont ensuite transfectées ou non par un vecteur codant pour FOG-1. 48h après transfection, la prolifération cellulaire est mesurée toutes les 24h pendant 4 jours par fluorescence grâce au réactif Uptiblue.

Les résultats obtenus montrent tout d'abord qu'en absence de FOG-1, les trois formes de GATA-1 (WT, S310A et S310D) inhibent la prolifération cellulaire des NIH-3T3 de la même manière. La phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 n'a donc aucun effet sur l'inhibition de prolifération induite

par GATA-1/pRb. D'autre part, la présence de FOG-1 seul (MigR + FOG-1) n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire.

En revanche, lorsque FOG-1 est co-exprimé avec les différentes formes de GATA-1, nous pouvons remarquer que la prolifération cellulaire des NIH-3T3 augmente avec le niveau de phosphorylation de GATA-1. En effet, l'expression de FOG-1 ne supprime pas l'inhibition de prolifération induite par GATA-1-S310A. Par contre, FOG-1 induit la reprise de la prolifération des cellules exprimant GATA-1-WT et GATA-1-S310D. La reprise de prolifération induite par FOG-1 est plus importante dans les cellules exprimant GATA-1-S310D. **Nous pouvons alors conclure que la phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 permet la levée par FOG-1 de l'inhibition de prolifération induite par GATA-1/pRb.**

Dans le chapitre précédent, nous avions montré qu'une quantité de vecteur FOG-1 équivalente à celle de GATA-1 (1U) permettait l'interaction avec GATA-1-WT mais pas avec GATA-1-S310A, mais que l'augmentation de la quantité de FOG-1 (jusqu'à 50U) permettait l'apparition de complexes GATA-1-S310A/FOG-1 et la disparition concomitante des complexes GATA-1-S310A/pRb (**Figure 12**). Nous venons de montrer que FOG-1 ne lève pas l'inhibition de prolifération induite par GATA-1-S310A. L'augmentation de la quantité de FOG-1 permettrait-elle de corriger ce phénomène ?

Pour répondre à cette question, nous avons co-exprimé GATA-1-WT ou GATA-1-S310A avec des quantités croissantes de FOG-1 dans les cellules NIH-3T3 puis mesuré la prolifération cellulaire par fluorescence. Les résultats sont présentés **Figure 15**.

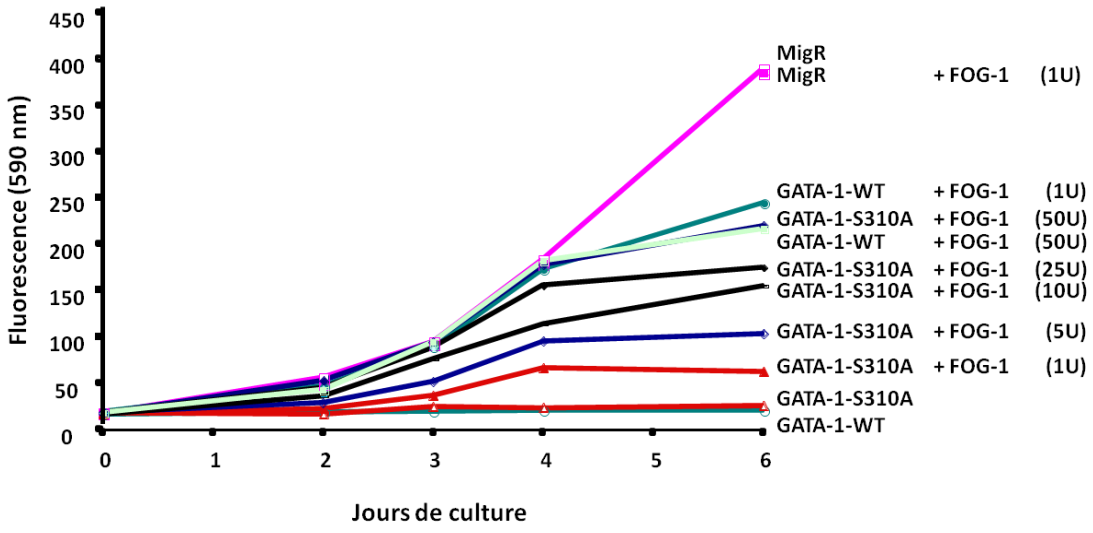


Figure 15 : <u>L'augmentation de la quantité de FOG-1 permet la levée de l'inhibition induite par GATA-1-S310A</u>
Les cellules NIH-3T3 sont transduites par des vecteurs rétroviraux codant pour les GATA-1-WT, GATA-1-S310A ou le vecteur vide Migr. Elles sont ensuite transfectées ou non par différentes quantités (1U à 50U) de vecteur codant pour la protéine FOG-1 : une quantité 1U correspond à une quantité équivalente de vecteurs GATA-1 et FOG-1 (100ng). La prolifération est mesurée pendant 6 jours par fluorescence à l'aide du réactif Uptiblue.

Comme précédemment, en absence de FOG-1, GATA-1-WT et GATA-1-S310A inhibent la prolifération cellulaire des NIH-3T3 de la même manière. L'expression de FOG-1 seul n'a aucun effet sur la prolifération (*MigR + FOG-1*). Et pour une quantité équivalente de FOG-1 (1U), l'inhibition de prolifération induite par GATA-1-WT est levée (*GATA-1-WT + FOG-1 (1U)*) tandis que celle induite par GATA-1-S310A ne l'est pas (*GATA-1-S310A + FOG-1 (1U)*). Ensuite, nous pouvons remarquer que, quelle que soit la quantité de FOG-1, son effet est le même sur l'inhibition de prolifération induite par GATA-1-WT. En effet, les cellules *GATA-1-WT + FOG-1 (1U)* et *GATA-1-WT + FOG-1 (50U)* prolifèrent de la même manière. Cela signifie que l'effet de FOG-1 sur l'arrêt de prolifération induit par GATA-1-WT est déjà maximal avec une quantité 1U de FOG-1. Enfin, l'augmentation de la quantité de FOG-1 permet de supprimer l'arrêt de prolifération induit par GATA-1-S310A. Cet effet est proportionnel à la quantité de FOG-1 exprimée. Plus la quantité de FOG-1 est élevée, plus la prolifération cellulaire est importante. Pour une quantité de FOG-1 équivalente à 50U, l'effet est maximal et équivalent à celui observé avec GATA-1-WT. **En absence de phosphorylation, l'augmentation de la quantité de FOG-1 permet de lever l'inhibition de prolifération induite par GATA-1.**

L'ensemble de ces résultats montre que la phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 facilite la levée par FOG-1 de l'inhibition de prolifération induite par GATA-1. Cependant, l'augmentation de la quantité de FOG-1 permet de compenser l'absence de phosphorylation. La phosphorylation de GATA-1 n'est donc pas indispensable à la levée par FOG-1 de l'inhibition de la prolifération, mais sa présence diminue la quantité de protéines FOG-1 nécessaires à cet effet.

Nous pouvons noter que ces résultats sont parfaitement corrélés aux résultats du chapitre précédent montrant que la phosphorylation de GATA-1 augmente son affinité pour FOG-1, facilitant la formation de complexes GATA-1/FOG-1 au détriment des complexes GATA-1/pRb (**Figure 12**).

3.2. Quel est l'effet de la phosphorylation sur la régulation de la fonction transactivatrice de GATA-1 par FOG-1 ?

La fonction principale de GATA-1 est la transactivation des gènes érythroïdes. Une des fonctions de FOG-1 consiste à réprimer cette transactivation. L'ensemble des résultats obtenus jusqu'à présent montre que GATA-1 se lie à FOG-1 avec plus ou moins d'affinité en fonction de son état de phosphorylation. Quel est alors l'effet de la phosphorylation sur la régulation par FOG-1 de l'activité transactivatrice de GATA-1 ?

Nous avons étudié la fonction transactivatrice de GATA-1 et sa répression par FOG-1 en fonction de l'état de phosphorylation de GATA-1. Pour cela, nous avons utilisé des promoteurs couplés au gène-rapporteur de la luciférase. Nous avons ainsi étudié cinq promoteurs minimum :

- un promoteur synthétique de base contenant un concatémère de trois sites GATA (3xluc) (Zhang et al., 2000)
- le promoteur basal du récepteur à l'érythropoïétine (Epo-R) (Maouche et al., 1994)
- le promoteur de la porphobilinogène désaminase (PBGD) (Chretien et al., 1988; Eleouet and Roméo, 1993)
- le promoteur de la glycophorine B (GpB95) (Rahuel et al., 1992)
- le promoteur érythroïde-spécifique de GATA-1 avec les éléments régulateurs en amont « IE3.9int » (G1HE) (Ohneda et al., 2002).

Ces cinq promoteurs ont été insérés dans le plasmide pGL3 en amont du gène codant pour la luciférase.

Les plasmides contenant les cinq promoteurs ainsi que le plasmide vide (pGL3) ont été transfectés dans des cellules NIH-3T3 avec les plasmides codant pour les différentes formes de GATA-1 ou le plasmide vide (MigR) (**Figure 16A**). Les résultats montrent que toutes les formes de GATA-1 testées sont capables de transactiver les cinq promoteurs étudiés. Les mutations S310A, S310D et V205G n'ont donc pas d'effet sur la liaison à l'ADN et l'activité transactivatrice de GATA-1 sur ces promoteurs.

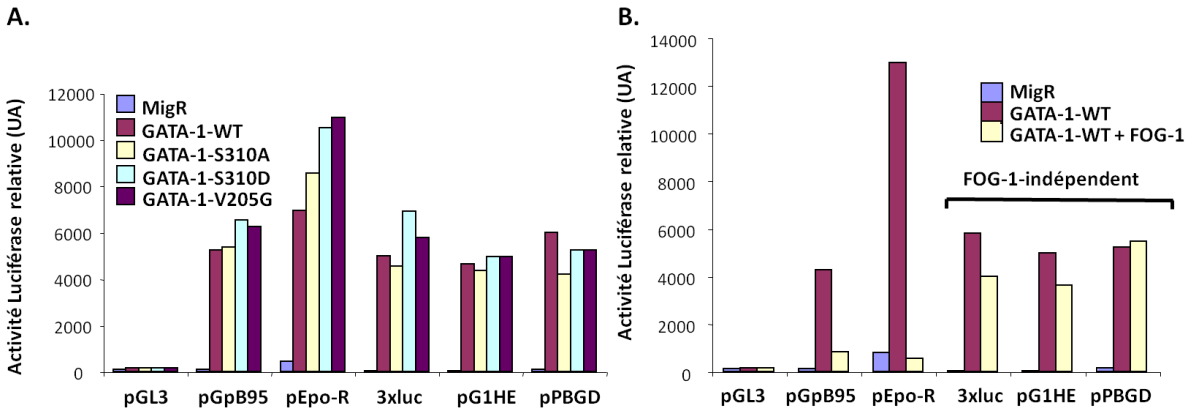


Figure 16 : <u>La répression de la fonction transactivatrice de GATA-1-WT par FOG-1 dépend des promoteurs ciblés</u>
Cinq promoteurs minimum cibles de GATA-1 (pGpB95, pEpo-R, pG1HE, pPBGD ou un promoteur synthétique contenant 3 sites GATA) ont été insérés dans le plasmide pGL3 en amont du gène de la luciférase. Ces plasmides ont été exprimés dans les NIH-3T3 avec différentes formes de GATA-1 (**A**) ou avec GATA-1-WT seul ou en présence de FOG-1 (**B**). L'activité luciférase induite a été mesurée par luminescence.

Nous avons ensuite évalué la répression par FOG-1 de la transactivation de ces promoteurs par GATA-1-WT (**Figure 16B**). GATA-1-WT active la transcription du gène luciférase pour les cinq promoteurs. La présence de FOG-1 en revanche n'a pas le même effet pour tous les promoteurs. Au

niveau des promoteurs de la Glycophorine B (pGpB95) et du récepteur à l'Epo (pEpo-R), la présence de FOG-1 induit une répression trancriptionnelle. Par contre, elle n'a pas d'effet sur la transactivation des promoteurs de GATA-1 (pG1HE), de la Porphobilinogène Désaminase (pPBGD) ou du promoteur contenant les trois sites GATA (3xluc). Nous pouvons alors classer les 5 promoteurs étudiés en deux groupes :

1- les promoteurs sensibles à la répression par FOG-1 : pGpB95 et pEpo-R

2- les promoteurs insensibles à la répression par FOG-1 : pG1HE, pPBGD et 3xluc.

Nous avons ensuite évalué l'effet de la phosphorylation de GATA-1 sur la répression FOG-1-dépendante de la transactivation des promoteurs par GATA-1. Pour cela, nous avons exprimé les différentes formes de GATA-1 (WT, S310A, S310D et V205G) en présence ou non de FOG-1 ou du mutant FOG-1-S706R capable de lier GATA-1-V205G, dans les NIH-3T3, avec les différents plasmides luciférases (**Figure 17**).

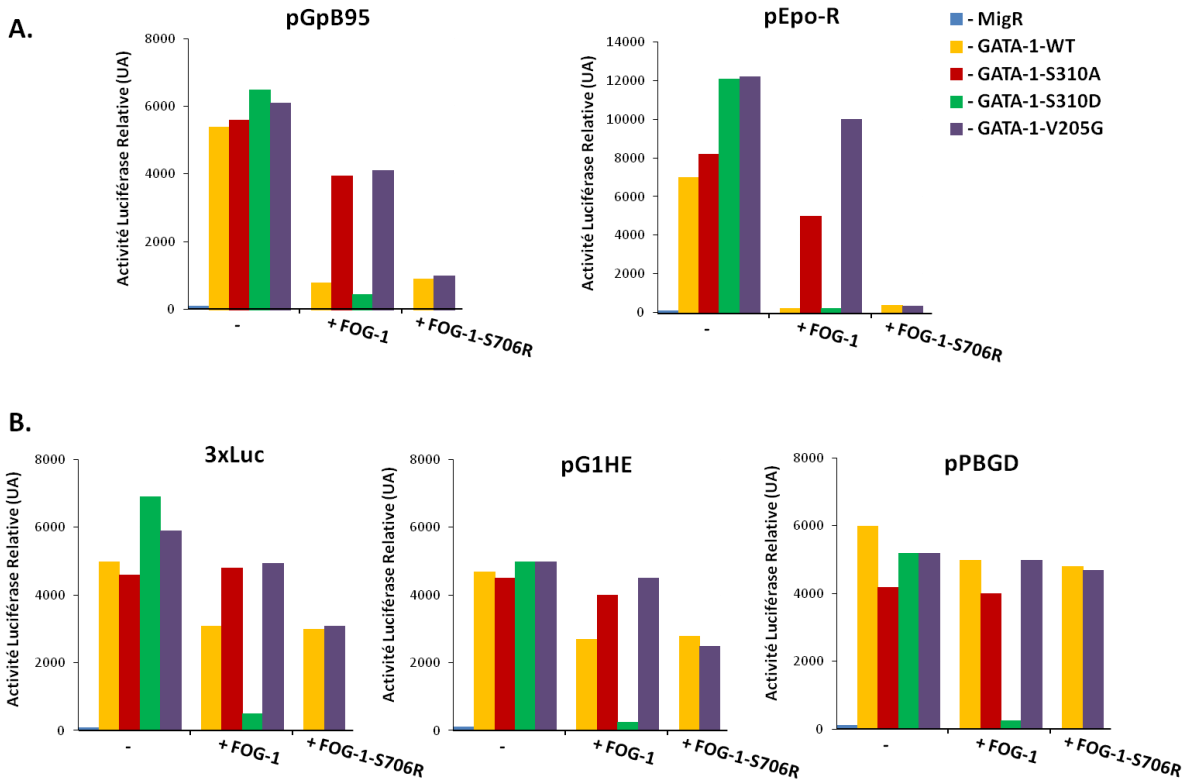


Figure 17 : <u>La phosphorylation de GATA-1 régule la répression transcriptionnelle FOG-1-dépendante</u>
L'activité transcriptionnelle des différentes formes de GATA-1, associées ou non à FOG-1 ou FOG-1-S706R, a été évaluée par le gène rapporteur luciférase au niveau des promoteurs sensibles à la répression par FOG-1 (pGpB95 et pEpo-R) (**A**) et des promoteurs insensibles à la répression par FOG-1 (3xluc, pG1HE et pPBGD) (**B**). L'activité luciférase a été mesurée par luminescence.

Comme précédemment, toutes les formes de GATA-1 (WT, S310A, S310D et V205G) activent la transcription au niveau des cinq promoteurs étudiés, et lorsque GATA-1-WT est exprimé, FOG-1 réprime la transactivation au niveau des promoteurs pGpB et pEpo-R (**Figure 17A**) mais pas celle des promoteurs pG1HE, pPBGD ni 3xluc (**Figure 17B**). Le même résultat est observé en présence de GATA-1-WT+FOG-1-S706R et GATA-1-V205G+FOG-1S706R. Par contre, GATA-1-V205G ne pouvant pas interagir avec FOG-1, ce dernier n'a pas d'effet sur son activité transcriptionnelle.

En ce qui concerne la phosphorylation de GATA-1, nous pouvons remarquer que pour les promoteurs sensibles à FOG-1 (pGpB95 et pEpo-R), la répression dépend du niveau de phosphorylation de GATA-1. En effet, la répression transcriptionnelle est partielle lorsque GATA-1-S310A et FOG-1 sont exprimés, mais elle est totale lorsque GATA-1-WT ou GATA-1-S310D sont exprimés avec FOG-1 (**Figure 17A**). Par contre, pour les promoteurs 3xluc, pG1HE et pPBGD, qui semblaient insensibles à la répression par FOG-1, nous pouvons noter que la phosphorylation constitutive de GATA-1 (GATA-1-S310D) restaure la répression transcriptionnelle FOG-1-dépendante (**Figure 17B**). La phosphorylation constitutive de GATA-1 semble augmenter la formation et donc la quantité de complexes GATA-1/FOG-1, permettant ainsi la répression FOG-1-dépendante de ces promoteurs.

Les deux groupes de promoteurs peuvent alors être redéfinis de la manière suivante :

1- pGpB95 et pEpo-R sont très sensibles aux complexes GATA-1/FOG-1 et une faible quantité de complexes suffit à réprimer leur transcription,
2- 3xluc, pG1HE et pPBGD sont moins sensibles et nécessitent une grande quantité de complexes GATA-1/FOG-1 pour leur répression transcriptionnelle.

Ces résultats montrent que la phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 régule la répression FOG-1-dépendante de l'activité transactivatrice de GATA-1. En régulant l'apparition des complexes GATA-1/FOG-1, elle permet la répression différentielle des différents promoteurs en fonction de leur sensibilité aux complexes GATA-1/FOG-1.

Il me paraît important de rappeler ici que ces résultats n'ont pas de relevance physiologique. Cette étude a été réalisée avec des promoteurs minimum et ne reflète pas la régulation transcriptionnelle réelle des gènes concernés. Il s'agit d'un système reconstitué permettant d'étudier de manière simple la mécanistique de transactivation GATA-1/FOG-1-dépendante en fonction de l'état de phosphorylation de GATA-1.

Cependant, cette étude a permis de mettre en évidence que les promoteurs cibles de GATA-1 ont des sensibilités variées à la présence des complexes GATA-1/FOG-1, et que l'activité transcriptionnelle de GATA-1/FOG-1 est régulée par la phosphorylation de GATA-1.

Conclusion I

Les études précédentes du laboratoire ont établi l'existence d'un équilibre dynamique entre les complexes GATA-1/pRb, responsable de l'arrêt de prolifération cellulaire, et GATA-1/FOG-1 impliqué dans la différenciation érythroïde (Kadri et al., 2009). Les résultats obtenus dans cette première partie montrent que la phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 par Akt en réponse à la signalisation Epo permet de réguler cet équilibre protéique. En effet, nous avons montré dans des modèles érythroïde et non érythroïde que FOG-1 interagit préférentiellement avec la forme phosphorylée de GATA-1 et permet de supprimer l'arrêt de prolifération induit par GATA-1 quand celui-ci est phosphorylé. La phosphorylation de GATA-1 permet donc de déplacer l'équilibre moléculaire vers la formation du complexe GATA-1/FOG-1. Cependant, il ne s'agit pas d'un mécanisme de type « tout ou rien », mais plutôt d'une question d'affinité. En effet, si la phosphorylation de GATA-1 facilite l'interaction avec FOG-1, ce dernier est tout de même capable d'interagir avec la forme non phosphorylée de GATA-1 s'il est présent en quantité suffisante. L'augmentation de la quantité de FOG-1 permet aussi le déplacement de l'équilibre protéique.

Nous proposons alors un modèle moléculaire dans lequel la phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 par Akt en réponse à l'Epo permet le déplacement de l'équilibre dynamique vers la formation du complexe GATA-1/FOG-1. Elle permet ainsi d'une part, la dissociation du complexe GATA-1/pRb/E2F et la reprise du cycle cellulaire, d'autre part l'activité transcriptionnelle GATA-1/FOG-1-dépendante nécessaire à la différenciation érythroïde terminale.

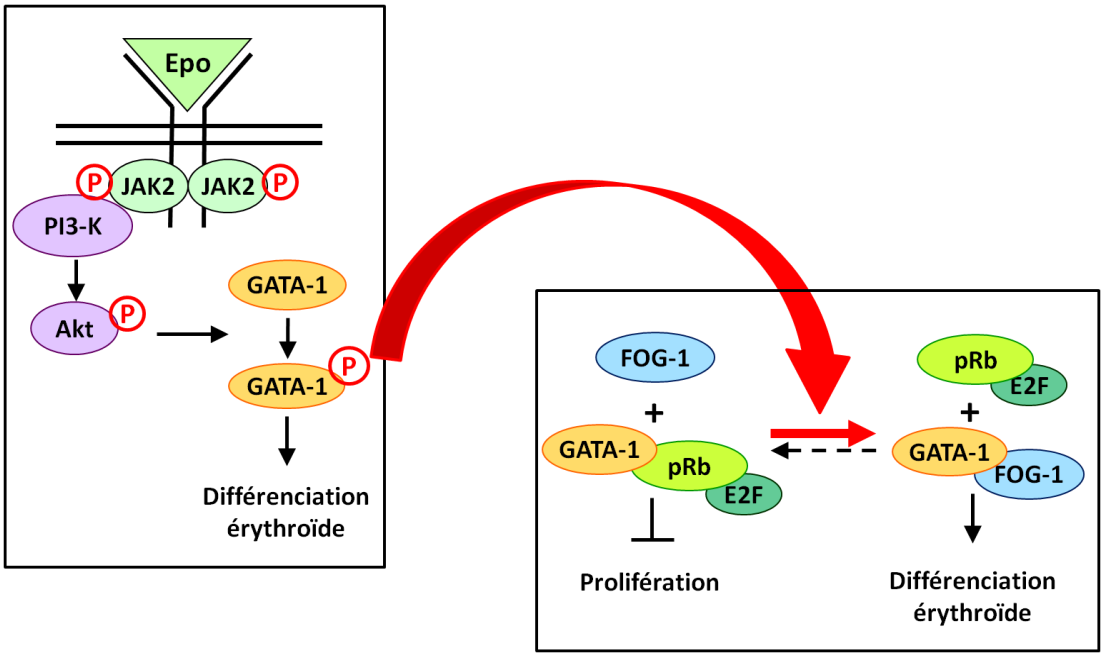
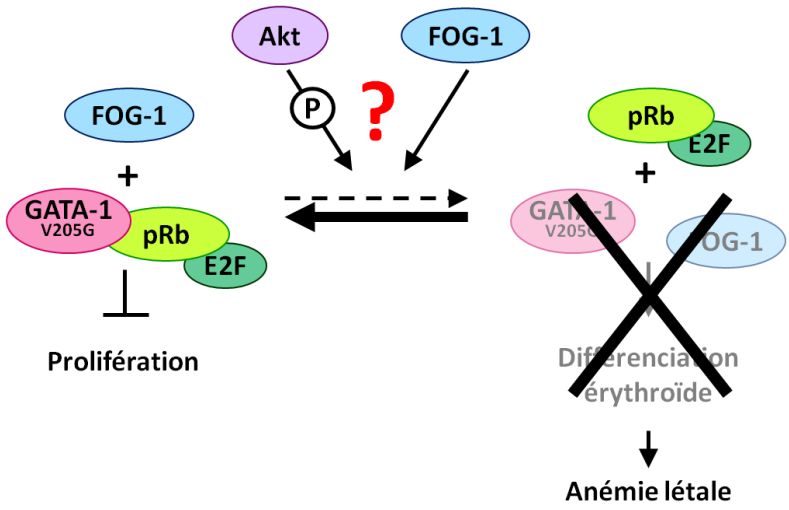


Figure 18 : Modèle d'équilibre moléculaire proposé
La phosphorylation de GATA-1 régule l'équilibre moléculaire entre GATA-1/pRb et GATA-1/FOG-1.

II. Application à un modèle de pathologie humaine : restauration *in vitro* du phénotype induit par la protéine GATA-1-V205G



Nous avons proposé un modèle moléculaire dans lequel la phosphorylation de GATA-1 par Akt sur la Ser310 régule sa répartition dans les deux complexes GATA-1/pRb et GATA-1/FOG-1. Plus précisément, elle favorise l'interaction de GATA-1 avec son cofacteur FOG-1 au détriment de pRb, levant ainsi l'inhibition de prolifération induite par GATA-1/pRb et permettant la transcription de gènes GATA-1/FOG-1-dépendants.

L'interaction GATA-1/FOG-1 joue un rôle crucial dans la différenciation érythroïde. Une mutation de GATA-1 rendant impossible son interaction avec FOG-1 (GATA-1-V205G) bloque la maturation érythroïde terminale des cellules *in vitro* (Crispino et al., 1999) et entraîne une anémie létale chez la souris (Chang et al., 2002). Une mutation similaire (GATA-1-V205M) entraîne chez des patients une anémie dysérythropoïétique sévère (Nichols et al., 2000).

Puisque la phosphorylation de GATA-1 augmente son affinité pour FOG-1, nous nous sommes interrogés sur l'état de phosphorylation de la protéine GATA-1-V205G incapable d'interagir avec FOG-1.

1. La protéine GATA-1-V205G est-elle phosphorylée par Akt sur la Ser310 ?

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé la lignée cellulaire non érythroïde NIH-3T3 dans laquelle nous avons exprimé par transduction différentes formes de GATA-1 : GATA-1-WT, GATA-1-S310A et GATA-1-V205G. Les cellules ont été cultivées pendant 24h dans un milieu appauvri en facteurs de croissance, de manière à réduire la signalisation cellulaire à un niveau minimal. Elles ont ensuite été stimulées par du PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) pour réactiver la signalisation et notamment la voie PI3K/Akt qui induit la phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310. L'activation de la kinase Akt et la phosphorylation de GATA-1 ont été visualisées par Western Blot. Les résultats sont présentés **figure 19**.

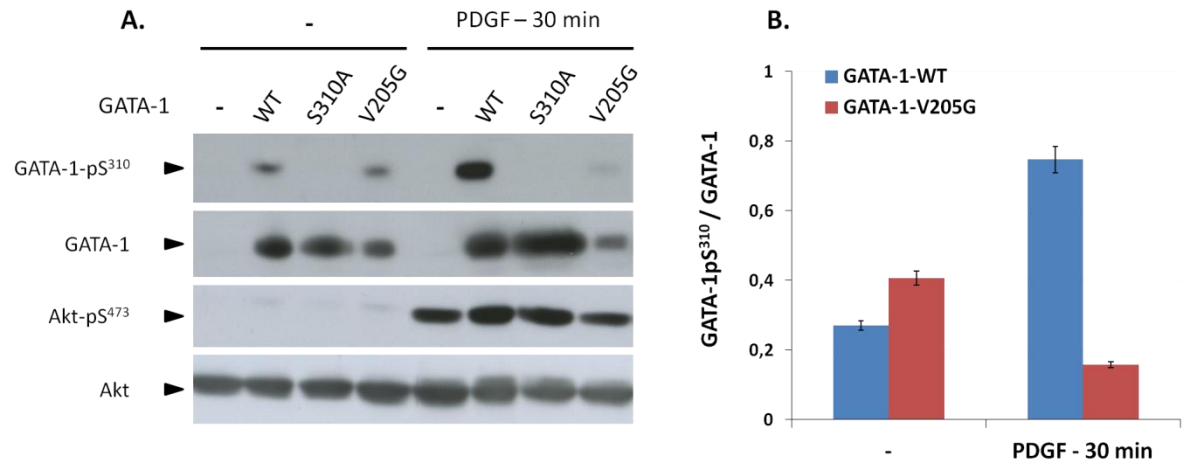


Figure 19 : <u>La protéine GATA-1-V205G n'est pas phosphorylée par Akt</u>
Des cellules NIH-3T3 transduites par GATA-1-WT, GATA-1-S310A, GATA-1-V205G ou le vecteur vide MigR (-) sont cultivées en DMEM + 0,5% SVF pendant 24h. Elles sont ensuite incubées ou non (-) avec 50ng/mL de PDGF à 37°C pendant 30 minutes. La réaction a été arrêtée par ajout de PBS + inhibiteurs de phosphatases à 4°C. **A.** Après lyse, la fraction nucléaire est déposée sur gel SDS-PAGE puis analysée par Western Blot. **B.** Le signal GATA-1pS^{310} observé dans les extraits GATA-1-WT et GATA-1-V205G a été quantifié puis rapporté au signal GATA-1 total.

Comme le montre la **figure 19A**, en conditions de culture appauvries (-), l'extinction de la voie PI3K/Akt est vérifiée par l'absence de phosphorylation de la kinase Akt (Akt-pS^{473}). Dans ces conditions, on observe un signal basal de phosphorylation des protéines GATA-1-WT et GATA-1-V205G, qui n'est pas observé pour GATA-1-S310A où le site de phosphorylation est supprimé. Après stimulation par le PDGF (PDGF – 30 min), l'activation de la signalisation est mise en évidence par la phosphorylation d'Akt. On observe alors une augmentation significative de la phosphorylation de GATA-1-WT. Cette augmentation n'est pas observée pour la protéine GATA-1-V205G. Malgré l'activation de la signalisation PDGF/PI3K/Akt, le signal GATA-1pS^{310} reste à un niveau basal dans les cellules exprimant GATA-1-V205G.

Il semble donc que la protéine GATA-1-V205G, incapable d'interagir avec FOG-1, ne soit pas phosphorylée par Akt sur la Ser310. On peut supposer que la mutation de la Val205 change la conformation de la protéine et empêche soit l'accès au site de phosphorylation, soit la fixation de la kinase sur la protéine. Il est également possible que la protéine GATA-1-V205G subisse un excès de déphosphorylation.

D'après le modèle moléculaire proposé dans le chapitre précédent, la phosphorylation de GATA-1 favorise l'interaction GATA-1/FOG-1 nécessaire à la différenciation érythroïde terminale (cf Fig18 p101). Peut-on alors appliquer ce modèle à la protéine GATA-1-V205G ? La phosphorylation constitutive de la protéine GATA-1-V205G permettrait-elle de restaurer son interaction avec FOG-1 et ainsi sa capacité à induire une différenciation érythroïde ?

Nous avons choisi d'étudier directement l'effet de la phosphorylation constitutive de la protéine GATA-1-V205G sur la différenciation érythroïde terminale.

2. La phosphorylation constitutive de GATA-1-V205G restaure-t-elle sa capacité à induire une différenciation érythroïde terminale ?

Pour étudier l'effet de la phosphorylation constitutive de GATA-1-V205G sur la différenciation érythroïde terminale, nous avons créé une nouvelle protéine mutée sur la Ser310 afin de mimer une phosphorylation constitutive : GATA-1-V205G-S310D. Puis, cette nouvelle protéine a été exprimée dans un modèle cellulaire érythroïde pour évaluer sa capacité à induire une différenciation érythroïde terminale.

2.1. Création de nouveaux vecteurs codant pour les protéines GATA-1-V205G-S310A et GATA-1-V205G-S310D

Pour mimer une phosphorylation constitutive de la protéine GATA-1-V205G, nous avons introduit une seconde mutation sur cette protéine au niveau du site de phosphorylation. La Ser310 a été remplacée par un Acide Aspartique, dont la charge négative s'apparente à la présence d'un groupement phosphate et mime ainsi une phosphorylation constitutive. Cette nouvelle protéine sera notée **GATA-1-V205G-S310D**. Pour s'assurer que l'effet observé ne sera pas du simplement à la mutation de la protéine mais bien à la phosphorylation constitutive en position 310, nous avons créé une deuxième protéine où la Ser310 est remplacée par une Alanine, acide aminé non phosphorylable : **GATA-1-V205G-S310A**. Cette mutation ne devrait avoir aucun effet sur la protéine.

Ces nouveaux mutants ont été créés par mutagenèse dirigée à partir des simples mutants GATA-1-S310A et GATA-1-S310D, à l'aide d'une amorce contenant la mutation V205G. Les plasmides obtenus ont été testés par digestion enzymatique et visualisation sur gel d'agarose, puis par séquençage. Nous avons alors sélectionné un plasmide correct de chaque mutant, que nous avons amplifié. Pour chacun des plasmides, l'expression de la protéine GATA-1 a été contrôlée par transfection dans les cellules HEK-293T comme le montre la **figure 20**.

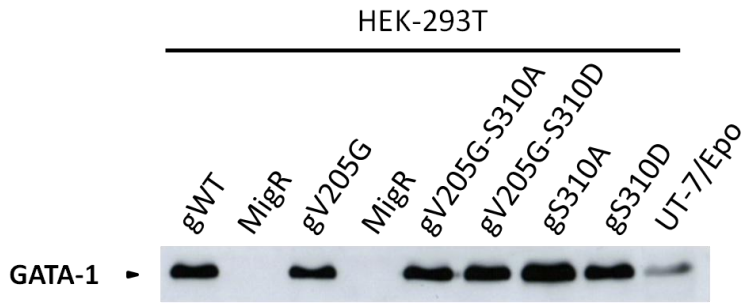


Figure 20 : <u>Contrôle d'expression des nouveaux plasmides GATA-1-V205G-S310A et GATA-1-V205G-S310D</u>
Les cellules HEK-293T sont transfectées par lipofection (Lipofectamine) avec les plasmides codant pour les protéines GATA-1-WT, GATA-1-V205G, GATA-1-V205G-S310A, GATA-1-V205G-S310D, GATA-1-S310A, GATA-1-S310D ou le vecteur vide (MigR). Les cellules sont lysées, puis la fraction nucléaire est déposée sur gel SDS-PAGE et analysée par Western Blot. Des extraits nucléaires d'UT-7/Epo sont utilisés comme contrôle pour l'expression de GATA-1.

La transfection des nouveaux plasmides dans les cellules HEK-293T induit bien l'expression de la protéine GATA-1. Nous avons alors utilisé ces plasmides pour la production de vecteurs rétroviraux qui nous ont servi à étudier l'effet de ces nouvelles mutations sur la différenciation érythroïde terminale.

2.2. <u>La protéine GATA-1-V205G-S310D est-elle capable d'induire une différenciation érythroïde terminale ?</u>

Afin d'évaluer la capacité de la protéine GATA-1-V205G-S310D à induire la différenciation érythroïde terminale, nous avons utilisé les lignées G1E et G1E-ER.

Les cellules G1E (GATA-1$^-$ Erythroid) dérivent de cellules souches embryonnaires (cellules ES) murines invalidées pour le gène *gata-1* (Weiss et al., 1997). Elles sont engagées dans le lignage érythroïde, mais l'absence de GATA-1 les empêche de poursuivre correctement leur maturation. Elles sont donc bloquées dans leur développement au stade proérythroblaste. Elles sont de phénotype c-Kit+, Ter119-. Elles servent de modèle pour l'étude de la différenciation érythroïde terminale car elles ont la particularité de reprendre leur maturation dès lors que l'expression de GATA-1 est restaurée.

Les cellules G1E-ER sont un sous-clone des G1E exprimant stablement une protéine GATA-1 fusionnée au domaine de liaison (Ligand Binding Domain) du récepteur aux œstrogènes (Estrogen Receptor – ER) notée GATA-1-ER (Tsang et al., 1997; Gregory et al., 1999). Cette protéine est exprimée de manière constitutive mais reste inactive en absence d'œstrogènes. Les cellules G1E-ER sont donc également bloquées au stade proérythroblaste et ont le même phénotype que les G1E (c-Kit+, Ter119-). La présence d'œstradiol dans le milieu de culture induit l'activation de la protéine GATA-1-ER et la reprise de la maturation érythroïde.

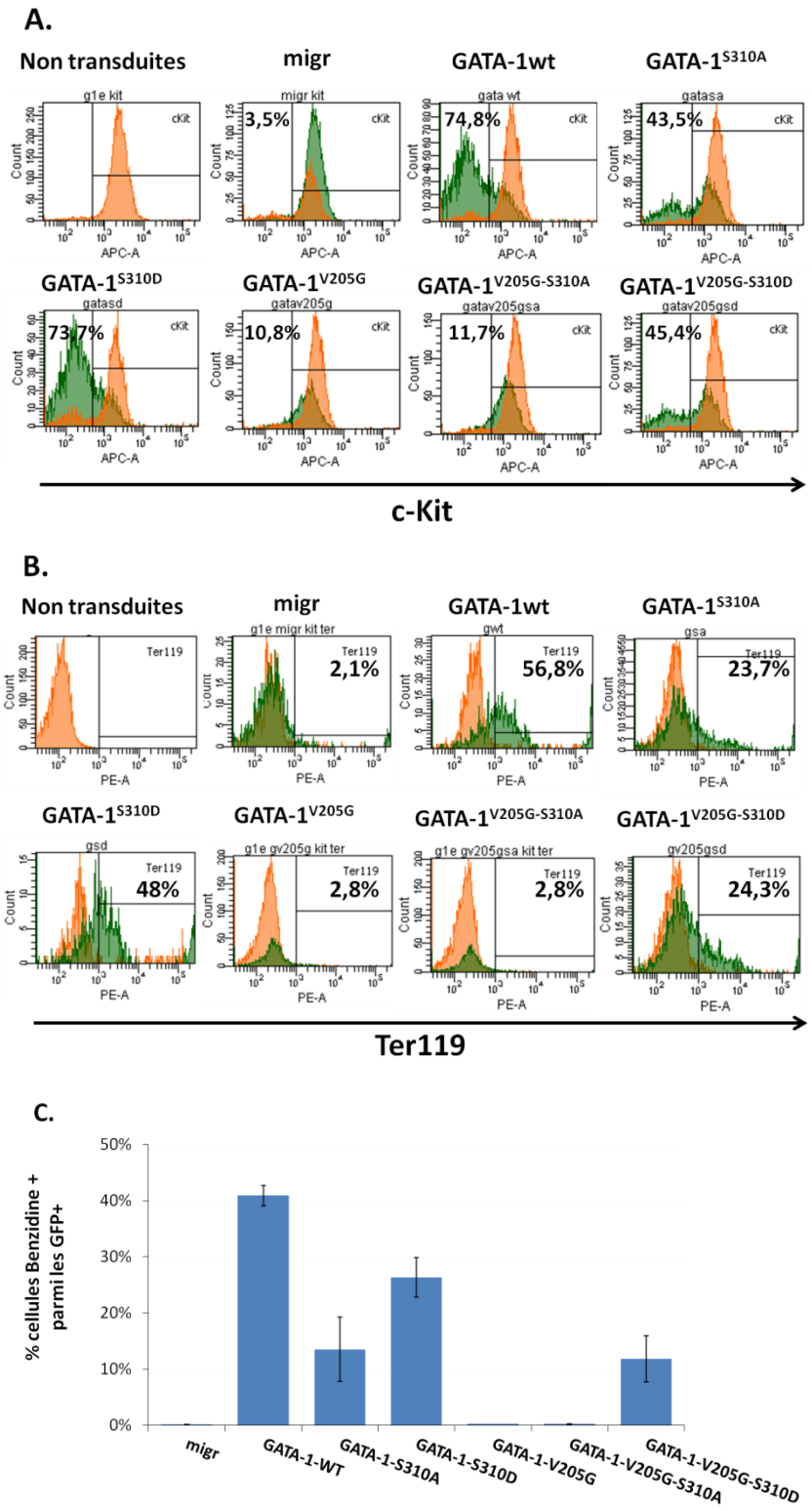


Figure 21 : <u>La protéine GATA-1-V205G-S310D restaure partiellement la différenciation érythroïde des cellules G1E</u>
Les cellules G1E sont transduites à J0 par des vecteurs rétroviraux codant pour les différentes formes de GATA-1 et la GFP. Pour chaque condition, le taux de transduction (% de cellules GFP-positives) est compris entre 50% et 80%. **A-B.** Le phénotype des cellules est déterminé en cytométrie de flux par un marquage c-Kit à J2 (**A**) et Ter119 à J5 (**B**). Les cellules GFP-positives sont représentées par le pic vert, les cellules GFP-négatives par le pic orange. Les pourcentages de cellules c-Kit-négatives (**A**) et de cellules Ter119-positives (**B**) sont indiqués dans chaque graphe. Les pourcentages indiqués sont mesurés parmi les cellules GFP-positives. **C.** A J6, l'hémoglobinisation des cellules est mesurée par une coloration benzidine. L'histogramme représente le pourcentage de cellules benzidine-positives rapporté aux cellules GFP+.

Pour notre étude, nous avons transduit ces cellules avec des vecteurs rétroviraux codant pour les différentes formes de GATA-1 puis analysé le phénotype des cellules transduites par cytométrie de flux. Pour cela, nous avons utilisé un marqueur précoce de l'érythropoïèse, **c-Kit**, qui disparaît de la surface cellulaire après le stade proérythroblaste, et un marqueur tardif de l'érythropoïèse, **Ter119**, caractéristique des stades terminaux. Les cellules transduites expriment la GFP. Pour évaluer l'avancement de la différenciation, nous avons déterminé parmi les cellules GFP+, le pourcentage de cellules négatives pour le marqueur c-Kit (**c-Kit-**) d'une part, et le pourcentage de cellules positives pour le Ter119 (**Ter119+**) d'autre part. Nous avons également mesuré l'hémoglobinisation des cellules par une coloration à la benzidine sur la totalité des cellules. La benzidine réagit avec l'hémoglobine présente dans les cellules et entraîne la formation d'un composé de couleur bleue. Nous avons obtenus des résultats similaires dans les lignées G1E et G1E-ER. Les résultats présentés **Figure 21** sont ceux de la lignée G1E.

Comme il a été montré précédemment (Kadri et al., 2005), les protéines GATA-1-WT et GATA-1-S310D induisent la différenciation des G1E de façon similaire, tandis que la différenciation induite par la protéine GATA-1-S310A est réduite. En effet, les pourcentages de cellules c-Kit- et Ter119+ ainsi que le pourcentage de cellules hémoglobinisées obtenus avec l'expression de GATA-1-S310A sont diminués d'environ deux fois par rapport à ceux obtenus avec GATA-1-WT et GATA-1-S310D. Les protéines GATA-1-V205G et GATA-1-V205G-S310A n'induisent quasiment aucune différenciation érythroïde. La mutation de la Ser310 empêchant la phosphorylation par Akt n'a aucun effet sur la protéine GATA-1-V205G. En revanche, les cellules exprimant la protéine GATA-1-V205G-S310D sont négatives pour c-Kit à 43,5% et positives pour Ter119 à 23,7%. De plus, environ 15% des cellules sont positives à la coloration benzidine. La différenciation observée est environ deux fois inférieure à celle induite par la protéine sauvage GATA-1-WT. **Ces résultats montrent que la phosphorylation constitutive de la protéine GATA-1-V205G, sous la forme GATA-1-V205G-S310D, permet de restaurer partiellement sa capacité à induire la maturation érythroïde des cellules G1E.**

D'autre part, nous pouvons noter que la quantité de cellules différenciées obtenues avec GATA-1-V205G-S310D est équivalente à celle obtenue avec GATA-1-S310A. La protéine GATA-1-V205G-S310D semble se comporter de manière équivalente à la protéine GATA-1-S310A.

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que, pour une quantité de GATA-1 constante, l'augmentation de la quantité de FOG-1 permettait l'apparition du complexe GATA-1-S310A/FOG-1. Peut-on appliquer ce phénomène à la différenciation érythroïde ? **L'augmentation de la quantité de protéines FOG-1 permettrait-elle de restaurer davantage la différenciation érythroïde induite par les protéines GATA-1-S310A et GATA-1-V205G-S310D ?**

3. L'augmentation de la quantité de FOG-1 restaure-t-elle la différenciation érythroïde induite par GATA-1-V205G-S310D ?

Nous venons de montrer que la phosphorylation constitutive du mutant GATA-1-V205G permettait de restaurer partiellement sa capacité à induire la maturation des cellules érythroïdes G1E. D'après les résultats obtenus dans le chapitre précédent, nous avons posé l'hypothèse que l'augmentation de la quantité de FOG-1 dans ces cellules pourrait permettre de restaurer davantage la différenciation érythroïde induite par GATA-1-V205G-S310D.

Nous avons alors créé des lignées cellulaires à partir de cellules G1E et G1E-ER exprimant une plus grande quantité de FOG-1, puis évalué la capacité des différents mutants de GATA-1 à induire la maturation érythroïde de ces nouvelles lignées.

3.1. Etablissement de nouvelles lignées G1E et G1E-ER surexprimant la protéine FOG-1

Pour créer des lignées de G1E et G1E-ER surexprimant FOG-1, nous avons transduit les cellules avec un vecteur rétroviral codant pour la protéine FOG-1 et exprimant la GFP. Des lignées contrôles exprimant le vecteur vide (MigR) ont également été créées. Après 14 jours de culture, les cellules exprimant toujours le vecteur (GFP-positives) ont été triées par FACS de deux manières différentes :

1) d'une part, nous avons effectué un tri en plaque 96 puits, de manière à obtenir une cellule GFP+ par puits. Après amplification, chaque cellule constituera alors un clone indépendant ;
2) d'autre part, nous avons effectué un tri en tubes de manière à obtenir un « pool » constitué d'une population hétérogène de cellules transduites.

Dans les deux cas, les cellules GFP+ ont été triées en trois populations distinctes séparées en fonction de leur intensité de fluorescence (MFI – Mean Fluorescence Intensity) : GFP-low (MFI=10^3), GFP-medium (MFI=10^4) et GFP-high (MFI=10^5). Les séquences codant pour FOG-1 et la GFP sont situées l'une à la suite de l'autre sur le vecteur, séparées par une séquence IRES (Internal Ribosome Entry Site). Partant de l'hypothèse que l'expression de la GFP est corrélée à celle de FOG-1, nous souhaitions, par ce tri, obtenir des populations cellulaires exprimant différentes quantités de FOG-1. Les cellules contrôles transduites par le vecteur vide MigR ont été triées en une seule population GFP+. Après deux à quatre semaines d'amplification selon les cas, chaque clone et pool obtenu a été congelé.

Malheureusement, très peu de clones ont pu être cultivés correctement après décongélation et parmi ceux que nous avons pu tester par la suite, aucun n'a donné de résultats cohérents. Nous avons donc utilisé les pools pour notre étude. Par ailleurs, la capacité des cellules G1E-ER à reprendre

leur différenciation en réponse aux œstrogènes nous permettra de valider les nouvelles lignées par un effet dose d'œstradiol (voir § *3.2.*).

La suite de notre étude portera donc sur les pools obtenus avec les cellules G1E-ER : le pool **G1E-ER-migr** contrôle, le pool **G1E-ER-Fog-1-low** et le pool **G1E-ER-Fog-1-med**. Le pool G1E-ER-Fog-1-high n'a pas pu être amplifié après tri.

L'intensité de fluorescence GFP et le niveau d'expression de Fog-1, mesuré par PCR-q, des trois lignées utilisées sont représentés en **Figure 22**.

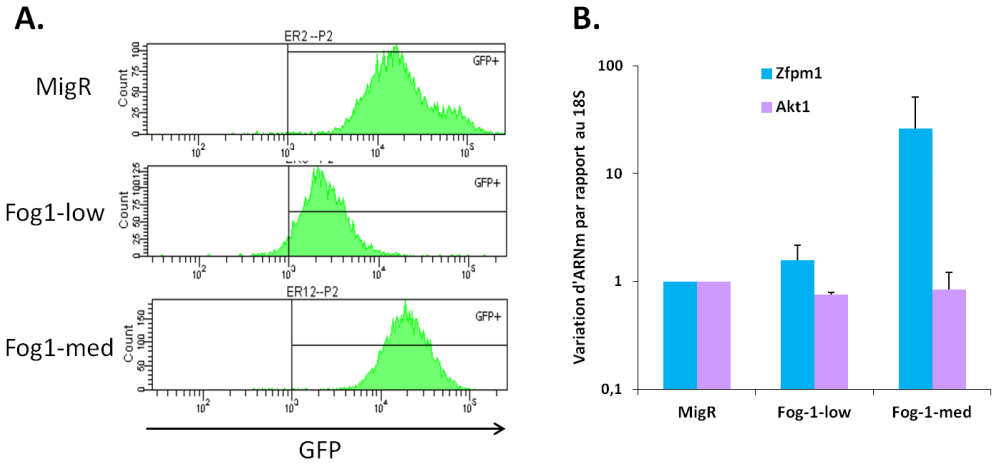


Figure 22 : <u>Caractéristiques des nouvelles lignées de G1E-ER surexprimant Fog-1</u>
Les cellules G1E-ER ont été transduites par un vecteur rétroviral codant pour la GFP et la protéine FOG-1 ou le vecteur codant uniquement pour la GFP (MigR). Elles ont été triées par FACS en fonction de leur intensité de fluorescence GFP (low ou med) représentée en (**A**). Les niveaux d'ARNm Fog-1 (Zfpm1) et Akt (Akt1) présents dans chaque lignée ont été mesurés par PCR-q (**B**).

3.2. <u>Validation physiologique des nouvelles lignées G1E-ER-Fog-1 par induction à l'œstradiol</u>

Afin de valider l'utilisation des nouvelles lignées G1E-ER-Fog-1 pour l'étude de la différenciation érythroïde, nous avons souhaité corréler la surexpression de FOG-1 à un effet physiologique sur la différenciation.

Les cellules G1E-ER expriment stablement la protéine de fusion GATA-1-ER. Celle-ci est activée par la présence d'œstrogènes dans le milieu de culture. L'activation de GATA-1-ER conduit à l'induction de la différenciation érythroïde et se traduit par une augmentation du niveau d'expression et de l'activité transcriptionnelle de la protéine proportionnellement à la quantité d'œstrogènes présents dans le milieu (Johnson et al., 2006). D'après notre modèle (proposé dans le chapitre précédent), l'augmentation de la quantité de FOG-1 favorise la formation des complexes GATA-1/FOG-1. Elle diminue alors la quantité de protéines GATA-1 nécessaires à la formation de ces complexes. Ainsi, pour obtenir un effet similaire, les lignées G1E-ER surexprimant la protéine FOG-1 devraient

nécessiter une plus faible quantité de protéines GATA-1-ER activées que les cellules G1E-ER. Elles devraient alors répondre à une dose d'œstradiol inférieure.

Ainsi, pour valider l'utilisation de ces nouvelles lignées, nous avons souhaité vérifier, d'une part, que l'activation de GATA-1-ER induit correctement la différenciation de ces cellules, et d'autre part, que la surexpression de FOG-1 diminue leur seuil de réponse à l'œstradiol. Pour cela, nous avons cultivé ces cellules en présence d'une quantité croissante d'œstradiol et comparé la différenciation érythroïde obtenue avec celle de la lignée initiale G1E-ER et de la lignée contrôle G1E-ER-migr. Habituellement, la concentration d'œstradiol utilisée sur les G1E-ER est de 10^{-7}M (Tsang et al., 1997; Gregory et al., 1999), nous avons donc défini une gamme de concentrations allant de $2{,}5.10^{-9}$ à 10^{-6}M. Les résultats sont présentés **Figure 23**.

Les cellules G1E-ER répondent très faiblement à une concentration de 1.10^{-8}M, mais leur réponse est maximale à partir de 5.10^{-8}M d'œstradiol comme l'indique le pourcentage de cellules c-Kit- et de cellules Ter119+ après 48h, ainsi que le pourcentage de cellules hémoglobinisées après 72h d'induction (50%). Les cellules G1E-ER-MigR semblent répondre plus fortement à des doses équivalentes : 50% des cellules sont positives à la benzidine après 72h d'induction par 1.10^{-8}M d'œstradiol. Cependant, elles atteignent leur maximum de différenciation (70% de cellules benzidine+) à la même concentration que les G1E-ER : 5.10^{-8}M. En revanche, la réponse des cellules G1E-ER-Fog-1-low est maximale dès la plus faible concentration testée : avec $2{,}5.10^{-9}$M d'œstradiol, 62,7% des cellules sont négatives pour c-Kit et 33% sont positives pour Ter119 après 48h, et 70% des cellules sont positives à la coloration benzidine après 72h.

La différenciation des nouvelles lignées G1E-ER-Fog-1 peut être induite par des doses d'œstradiol inférieures à celle nécessaire à la différenciation des cellules G1E-ER initiales. Grâce à la surexpression de FOG-1, ces nouvelles lignées nécessitent une quantité plus faible de GATA-1-ER activée pour poursuivre leur différenciation. Ces résultats nous permettent de corréler la surexpression de FOG-1 à un effet physiologique et ainsi de valider l'utilisation de ces nouvelles lignées pour la suite de l'étude.

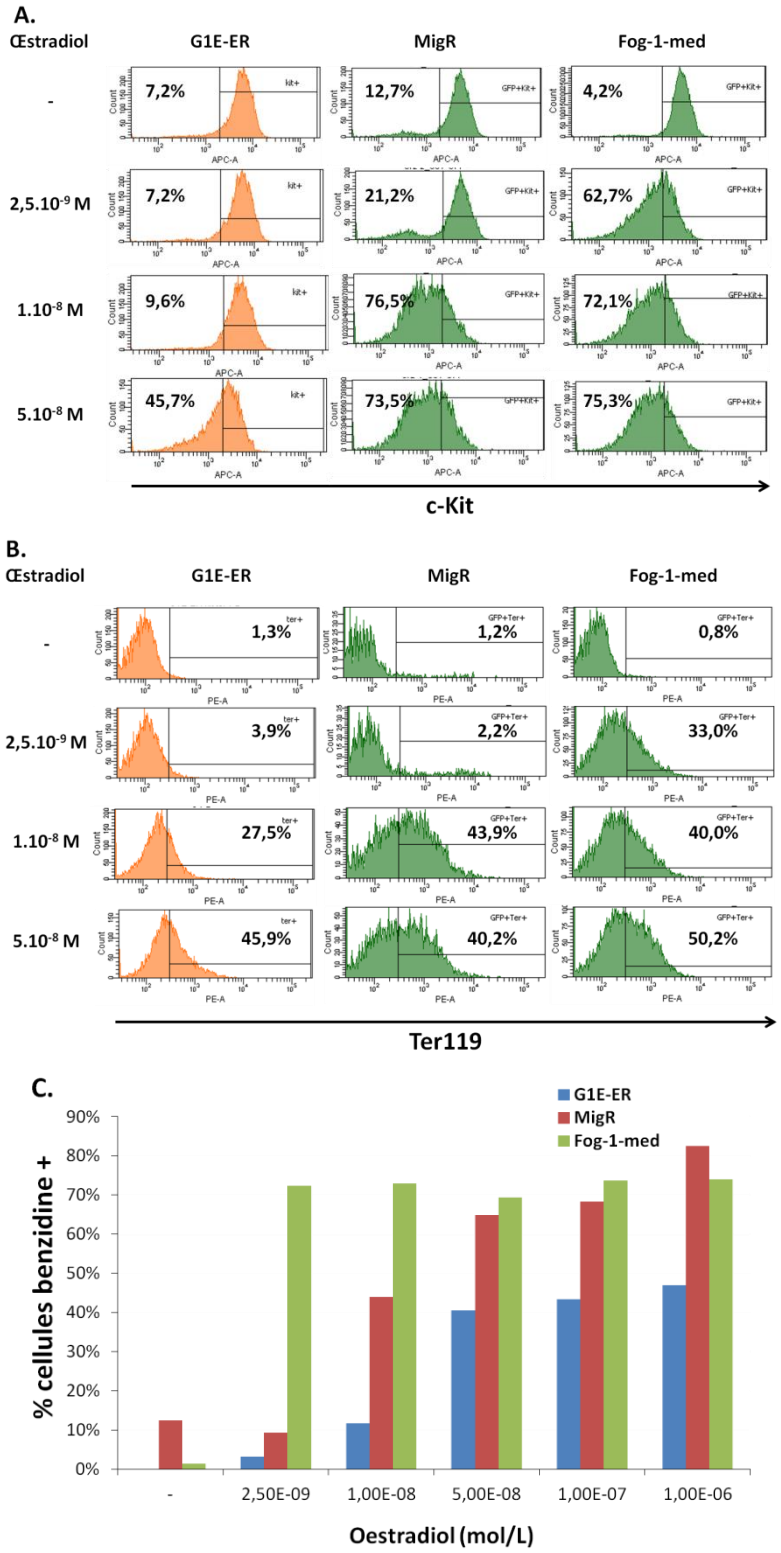


Figure 23 : <u>Les nouvelles lignées G1E-ER-Fog-1 répondent à des doses plus faibles d'œstradiol</u>
Les cellules G1E-ER, G1E-ER-MigR et G1E-ER-Fog-1-low sont cultivées en présence de doses croissantes de β-œstradiol ($2{,}5.10^{-9}$ à 10^{-6} mol/L). **A** et **B.** Après 48h d'induction, les pourcentages de cellules c-Kit-négatives et de cellules Ter119-positives sont mesurés par cytométrie en flux. **C.** Le pourcentage de cellules hémoglobinisées est mesuré après 72h d'induction par coloration à la benzidine.

3.3. La protéine GATA-1-V205G-S310D restaure-t-elle une différenciation érythroïde totale dans les cellules surexprimant FOG-1 ?

Pour évaluer l'effet de la surexpression de FOG-1 sur la différenciation érythroïde induite par la protéine GATA-1-V205G-S310D, nous avons transduit les nouvelles lignées G1E-ER-Fog-1 avec les différentes formes de la protéine GATA-1. L'induction de la différenciation érythroïde a été mesurée par cytométrie de flux grâce au marqueur Ter119 caractéristique des stades terminaux, et par coloration à la benzidine. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 24**.

Quelle que soit la lignée cellulaire, la protéine GATA-1-WT induit la maturation des cellules de la même manière : elle entraîne l'apparition d'environ 70% de cellules Ter119+ (**Fig24B**) et d'environ 60% de cellules positives à la benzidine (**Fig24C**). La surexpression de FOG-1 n'a donc pas d'effet sur la différenciation induite par GATA-1-WT. De plus, quelle que soit la lignée cellulaire, GATA-1-V205G et GATA-1-V205G-S310A n'induisent pas de différenciation érythroïde. La surexpression de FOG-1 seule n'est pas suffisante pour restaurer la différenciation érythroïde de GATA-1-V205G. Comme nous l'avons montré précédemment, les protéines GATA-1-S310A et GATA-1-V205G-S310D permettent une maturation partielle des cellules G1E-ER (histogramme bleu) : environ 40% des cellules exprimant GATA-1-S310A et 20% des cellules exprimant GATA-1-V205G-S310D sont positives pour le Ter119 (**Fig24B**) et la coloration benzidine (**Fig24C**). Nous pouvons remarquer que quelle que soit la condition, les résultats obtenus dans la lignée contrôle G1E-ER-MigR sont équivalents à ceux obtenus avec la lignée de départ G1E-ER. L'expression stable d'un vecteur exogène n'a donc pas d'effet en elle-même sur la différenciation érythroïde.

En revanche, dans les lignées G1E-ER-Fog-1-low (histogramme vert) et G1E-ER-Fog-1-med (histogramme violet), l'expression de la protéine GATA-1-V205G-S310D entraîne l'apparition de 70% de cellules Ter119+ (**Fig24A et B**) et 60% de cellules positives à la benzidine (**Fig24C**). Elle restaure la différenciation érythroïde au même niveau que la protéine GATA-1-WT. Il est intéressant de noter que la différenciation induite par GATA-1-S310A est également restaurée au même niveau que GATA-1-WT (70% de cellules Ter119+ et 60% de cellules benzidine+) dans la lignée G1E-ER-Fog-1-med. On ne retrouve pas ces résultats dans la lignée G1E-ER-Fog-1-low : la quantité de FOG-1 n'est peut-être pas suffisante pour restaurer une différenciation complète.

Ces résultats montrent que la surexpression de FOG-1 dans les cellules G1E-ER permet de restaurer totalement la différenciation érythroïde induite par la protéine GATA-1-V205G-S310D. Elle restaure également la différenciation induite par GATA-1-S310A.

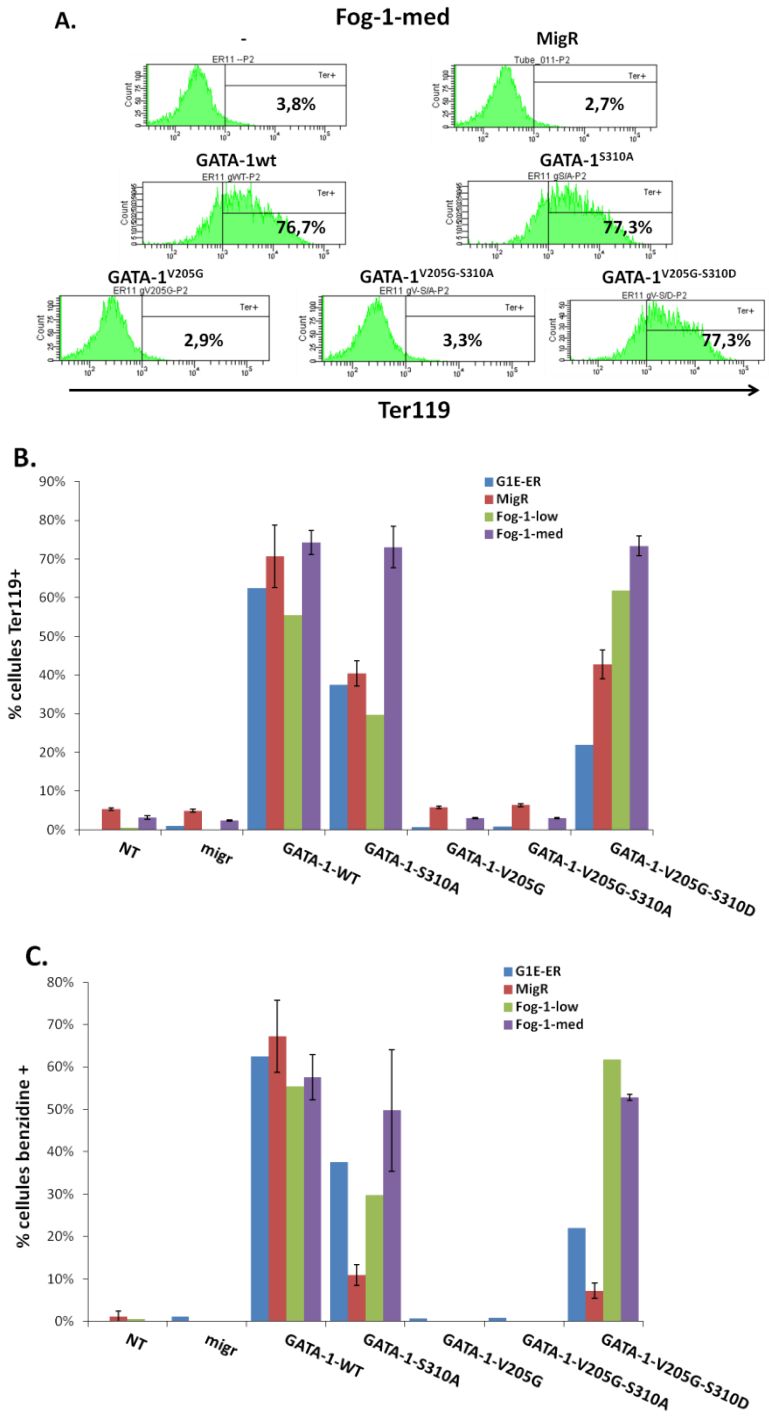


Figure 24 : <u>L'augmentation de la quantité de FOG-1 restaure totalement la différenciation érythroïde induite par GATA-1-V205G-S310D</u>

Les cellules G1E-ER, G1E-ER-MigR, G1E-ER-Fog-1-low et G1E-ER-Fog-1-med sont transduites ou non (NT) avec le vecteur vide (migr) ou les vecteurs codant pour GATA-1-WT, GATA-1-S310A, GATA-1-V205G, GATA-1-V205G-S310A ou GATA-1-V205G-S310D. Le taux de transduction est évalué par le % de GFP uniquement dans la lignée de départ G1E-ER, les autres lignées exprimant déjà la GFP. Pour chaque condition, le taux de transduction est d'environ 100%. A J5 après transduction, le pourcentage de cellules positives pour le marqueur de différenciation érythroïde terminale murin Ter119 est mesuré par cytométrie en flux. Les données de cytométrie de la lignée G1E-ER-Fog-1-med sont montrées à titre d'exemple (**A**). Toutes les données obtenues sont résumées dans l'histogramme (**B**). Une coloration benzidine est effectuée à J5, les pourcentages de cellules positives de chaque condition sont présentés dans l'histogramme (**C**).

Conclusion II

La mutation GATA-1-V205G abroge l'interaction GATA-1/FOG-1. Par conséquent, elle bloque la maturation érythroïde et entraîne une anémie létale chez la souris. Chez l'homme, une mutation similaire (GATA-1-V205M) entraîne une anémie dysérythropoïétique sévère.

Dans le chapitre précédent, nous avions défini un modèle moléculaire dans lequel la phosphorylation de GATA-1 par Akt et la quantité de protéines FOG-1 sont deux éléments régulateurs de la balance entre le contrôle de la prolifération et l'induction de la différenciation érythroïde. Nous avons alors tenté d'appliquer ce modèle moléculaire au cas de la mutation GATA-1-V205G.

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent que :

- la protéine GATA-1-V205G n'est pas phosphorylée par Akt sur la Ser310 ;
- la phosphorylation constitutive de cette protéine (GATA-1-V205G-S310D) restaure une différenciation érythroïde partielle *in vitro*, équivalente à celle induite par GATA-1-S310A ;
- l'augmentation de la quantité de FOG-1 permet de restaurer entièrement la différenciation érythroïde induite par les protéines GATA-1-V205G-S310D et GATA-1-S310A *in vitro*.

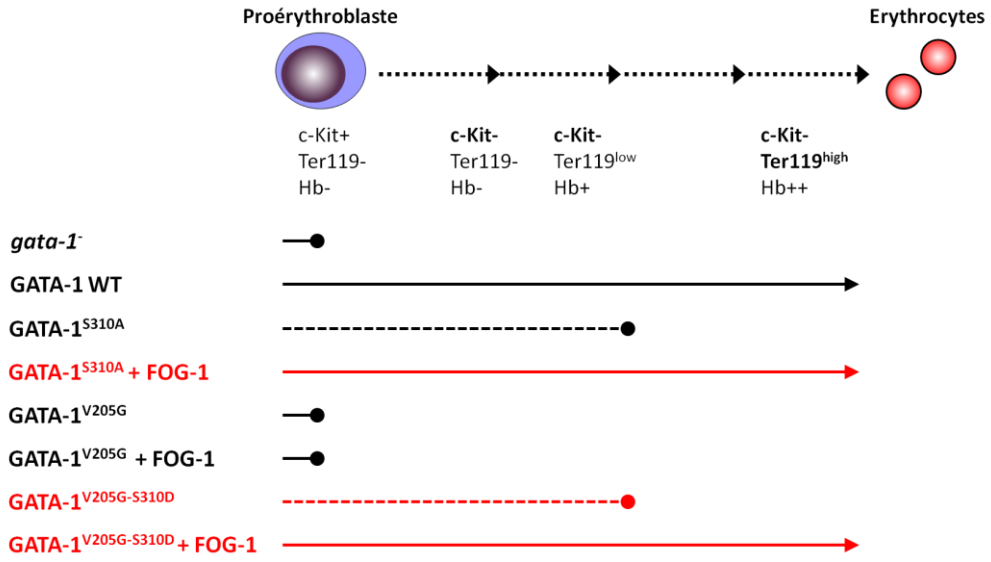


Figure 25 : La phosphorylation constitutive et l'augmentation de FOG-1 restaurent entièrement la différenciation érythroïde induite par GATA-1-V205G

Ainsi, nous avons validé notre modèle moléculaire en montrant qu'il est applicable au cas d'une protéine GATA-1 déficiente abrogeant la différenciation érythroïde et impliquée dans une pathologie humaine. L'application de ce modèle permet de restaurer le phénotype létal causé par une mutation ponctuelle du facteur de transcription érythroïde majeur GATA-1.

III. Application à un modèle physiologique : étude d'un modèle de souris Knock-In exprimant une protéine GATA-1 non phosphorylable par Akt – GATA-1-S310A



Les résultats présentés dans les chapitres précédents montrent que la phosphorylation de GATA-1 par Akt sur la Ser310 augmente l'affinité de GATA-1 pour FOG-1. Elle favorise ainsi la formation du complexe GATA-1/FOG-1, et la dissociation de GATA-1/pRb/E2F, permettant la reprise du cycle cellulaire et la poursuite de la différenciation érythroïde. Dans un contexte où l'affinité de GATA-1 pour FOG-1 est fortement réduite (mutants GATA-1-V205G et -S310A), la phosphorylation constitutive de GATA-1 et/ou l'augmentation de la quantité de FOG-1 permet de restaurer la différenciation érythroïde terminale. Tous ces résultats ont été obtenus *in vitro*.

Dans cette dernière partie de ma thèse, je me suis intéressée au rôle physiologique de la phosphorylation de GATA-1. Pour cela, j'ai utilisé le modèle transgénique murin établi par l'équipe de S.H. Orkin (Rooke and Orkin, 2006). Ces souris expriment une forme de GATA-1 non phosphorylable par Akt (GATA-1-S310A). L'étude de ces souris a montré qu'elles étaient viables et que leurs paramètres sanguins sont normaux. L'analyse des progéniteurs érythroïdes précoces médullaires par test clonogénique a montré que la capacité de différenciation des progéniteurs gata-1-S310A n'est pas affectée. L'analyse des stades terminaux de l'érythropoïèse a été réalisée par cytométrie à l'aide des marqueurs CD71/Ter119 : les proportions de chaque population sont identiques chez les souris gata-1-S310A et contrôles, indiquant qu'il n'y a pas de blocage de la différenciation érythroïde. L'analyse de l'érythropoïèse fœtale a été réalisée à E12.5, E14.5 et E17.5 : la capacité de différenciation des progéniteurs précoces gata-1-S310A est normale, et aucun blocage de la différenciation n'est mis en évidence. L'érythropoïèse de stress de ces souris semble normale : la réponse à une anémie aiguë induite par traitement à la phénylhydrazine est comparable à celle des souris contrôles. En conclusion, l'érythropoïèse fœtale et adulte des souris gata-1-S310A semble normale. Toutefois, les auteurs concluent que, même si les fonctions « critiques et non-redondantes » de GATA-1 ne semblent pas affectées par l'absence de phosphorylation de GATA-1, ils n'excluent pas un phénomène de compensation.

Au vu de nos résultats, nous avons posé l'hypothèse qu'il existe des mécanismes permettant de compenser l'absence de phosphorylation de GATA-1 *in vivo*. En effet, l'étude initiale des souris gata-1-S310A a été menée dans des conditions optimales : les progéniteurs érythroïdes ont été cultivés dans un milieu riche contenant de l'insuline, de l'holotransferrine, de l'Epo et du SCF. Ces facteurs extracellulaires sont tous de puissants activateurs des voies de signalisation et leur présence dans le milieu de culture peut masquer un défaut de prolifération et/ou de différenciation. De même, l'érythropoïèse fœtale a été étudiée à partir de E12.5, stade de développement où l'érythropoïèse définitive est déjà établie. On peut penser que, s'il existe des phénomènes de compensation, ils seront déjà établis à ce stade. Pour notre étude, nous nous placerons donc à un stade plus précoce de l'érythropoïèse fœtale (E11.5). De plus, nous étudierons les progéniteurs érythroïdes dans des conditions plus drastiques de culture.

1. L'érythropoïèse fœtale des souris gata-1-S310A est-elle équivalente à celle des souris contrôle ?

Afin d'évaluer l'implication de la phosphorylation de GATA-1 au cours de l'érythropoïèse fœtale, nous avons analysé les foies fœtaux d'embryons contrôles et gata-1-S310A à 11.5 jours de développement (E11.5). Pour cela, nous avons accouplé des souris âgées de 12 semaines. Afin de maîtriser au mieux l'âge des embryons, nous avons tout d'abord évalué dans notre cohorte de femelles la phase du cycle d'ovulation par frottis vaginal (Caligioni, 2009; Byers et al., 2012). Seules les femelles en pro-œstrus sont pesées puis accouplées. Le lendemain matin, le mâle est retiré : ce jour est alors défini comme jour de développement embryonnaire E0.5. Onze jours après, les femelles sont à nouveau pesées pour évaluer la présence d'embryons. Les femelles gestantes sont sacrifiées et le stade de développement des embryons est vérifié par observation de leur morphologie à la loupe binoculaire : à E11.5, on distingue nettement la tête et la vésicule cristallinienne, ainsi que la palette des membres supérieurs où les doigts ne sont pas encore apparents. Le foie de chacun des embryons est alors disséqué puis dissocié à l'aide d'une seringue et filtré sur une membrane de nylon de 30 µm. Les hépatocytes, dont la taille moyenne est de 40µm, seront ainsi retenus par le filtre, tandis que les progéniteurs érythroïdes (20-25µm) seront récupérés dans le filtrat.

Deux types de numération sont effectués :

1) Les cellules vivantes contenues dans chaque foie sont évaluées sur hémacytomètre après coloration au bleu trypan (**Fig26A**) ;

2) Afin d'évaluer la proportion de cellules érythroïdes dans la suspension cellulaire, nous utilisons une évaluation par cytométrie du pourcentage de cellules portant le marqueur de surface CD71. Ce marqueur correspond au récepteur à la transferrine et est exprimé exclusivement sur les cellules érythroïdes (Fraser et al., 2007). Le pourcentage de cellules CD71-positives (CD71+) est alors multiplié par le nombre total de cellules comptées afin d'obtenir le nombre de cellules CD71+ (**Fig26B**).

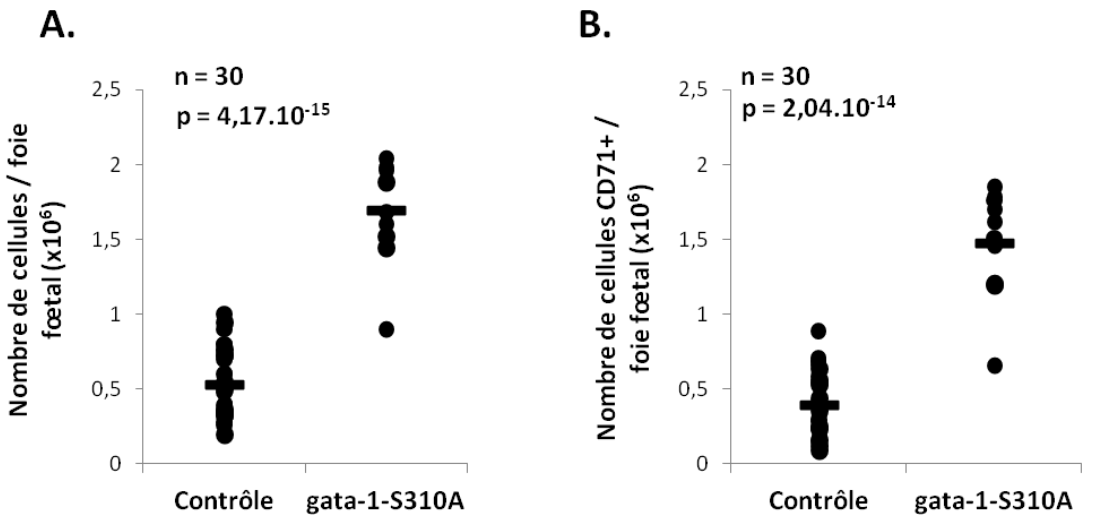


Figure 26 : <u>A E11.5, la cellularité des foies fœtaux des souris gata-1-S310A est différente de celle des souris contrôles</u>
Les foies fœtaux d'embryons Contrôle et gata-1-S310A à E11.5 sont disséqués puis dissociés à l'aide d'une seringue et filtré sur une membrane de nylon de 30µm. **A.** Les cellules vivantes sont dénombrées par une coloration au bleu trypan. **B.** Le pourcentage de cellules CD71+, marqueur érythroïde, est évalué par cytométrie. Il est ensuite rapporté au nombre de cellules total pour déterminer le nombre de cellules CD71+.

Les résultats montrent que les foies fœtaux d'embryons gata-1-S310A contiennent en moyenne 3,2 fois plus de cellules que les foies contrôles (**Fig26A**). La différence observée est hautement significative ($p = 4{,}17.10^{-15}$) sur un grand nombre d'échantillons. Si l'on s'intéresse à la fraction CD71+ correspondant aux cellules érythroïdes (**Fig26B**), on retrouve un ratio équivalent puisque le nombre de cellules CD71+ chez les souris gata-1-S310A est supérieur (environ 3,7 fois) par rapport aux souris contrôle et ce, de manière hautement significative ($p = 2{,}04.10^{-14}$). Ainsi, **à E11.5, stade de développement embryonnaire correspondant à l'installation de l'érythropoïèse définitive, la cellularité des foies fœtaux des souris gata-1-S310A est supérieure de plus de 3 fois à celle des souris contrôles.**

Afin d'analyser les différents stades de l'érythropoïèse, les cellules de chaque foie fœtal ont été marquées à l'aide d'anticorps anti-CD71 et anti-Ter119 couplés à des fluorochromes. L'expression dynamique de ces deux marqueurs permet la discrimination des différents stades de l'érythropoïèse chez la souris (Socolovsky et al., 2001; Zhang et al., 2003). Ces stades sont nommés de R1 à R5. Un marqueur de viabilité est également utilisé afin d'exclure les cellules mortes. Les résultats sont présentés dans la **Figure 27A**. Les valeurs obtenues pour chaque population sont regroupées sous forme d'histogramme (**Fig27B**).

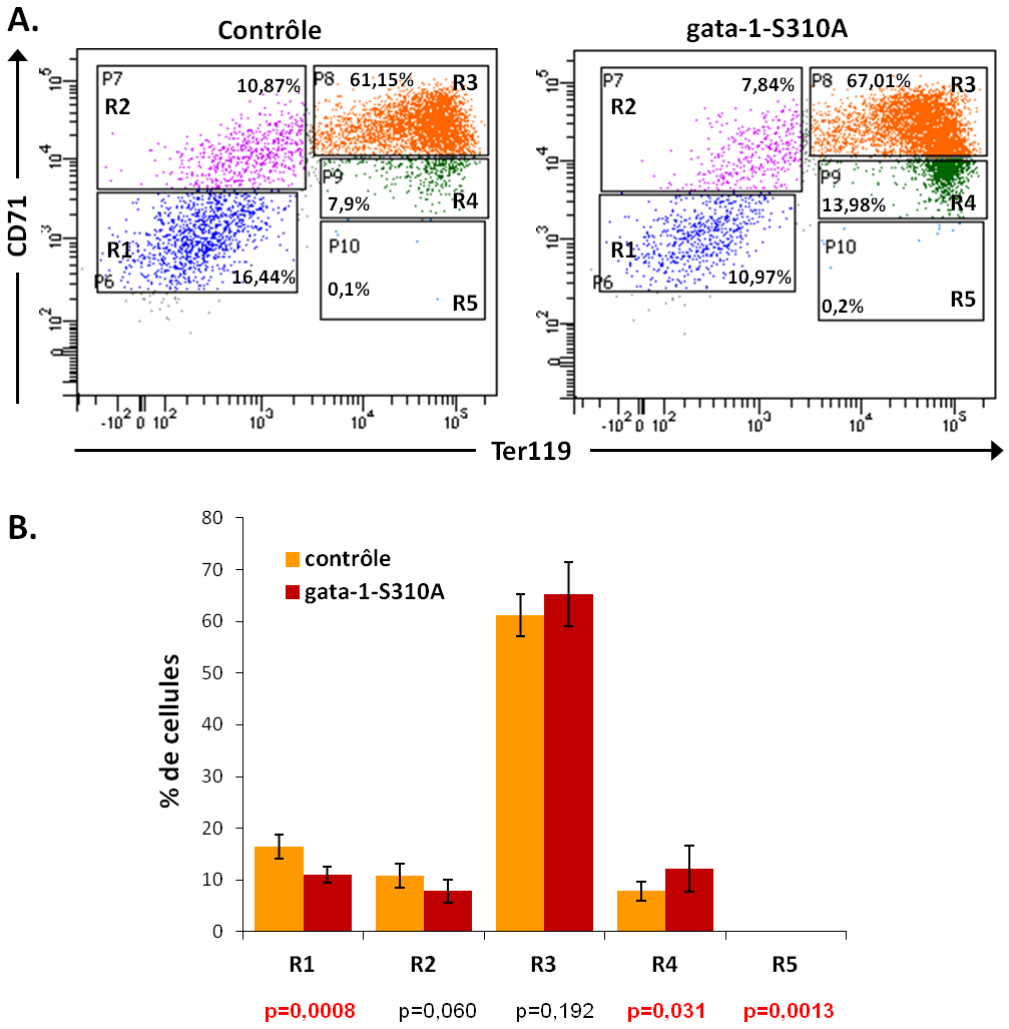


Figure 27 : <u>A E11.5, les foies fœtaux gata-1-S310A contiennent plus de cellules matures que les contrôles</u>
Les foies fœtaux d'embryons contrôle et gata-1-S310A à E11.5 sont disséqués puis dissociés à l'aide d'une seringue et filtré sur une membrane de nylon de 30µm. Les différentes populations érythroïdes (R1-R5) sont identifiées par un double marquage CD71/Ter119 et analysées par cytométrie en flux. (n=21). **A.** Deux images de cytométrie représentatives sont montrées. **B.** Les moyennes des pourcentages de chaque population pour chaque génotype sont représentées dans le graphique. Les probabilités (p=) sont calculées par le test de Student et sont indiquées en rouge lorsque la différence est significative. **R1** : progéniteurs précoces (BFU-e, CFU-e) ; **R2** : proérythroblastes ; **R3** : érythroblastes basophiles ; **R4** : érythroblastes polychromatophiles et acidophiles ; **R5** : réticulocytes.

Le graphique montre des différences significatives dans le pool des progéniteurs (**Figure 27**). En effet, la population R1, correspondant aux BFU-e et CFU-e (CD71-/Ter119-), est moins représentée chez les souris gata-1-S310A. On n'observe pas de différence significative pour les populations intermédiaires correspondant aux proérythroblastes (R2 : CD71+/Ter119-) et aux érythroblastes basophiles (R3 : $CD71^{high}$/Ter119+). Par contre, les populations les plus matures correspondant aux érythroblastes polychromatophiles, acidophiles et réticulocytes (R4 : $CD71^{low}$/Ter119+ et R5 : CD71-/Ter119+) sont plus représentées dans les embryons gata-1-S310A que dans les contrôles. On peut remarquer que dans les deux lignées, la population la plus mature est très faiblement représentée : ceci est du au stade précoce de développement (E11.5) choisi pour notre étude où l'énucléation des

acidophiles n'est pas encore installée. Malgré une apparente accélération de la différenciation érythroïde vers les stades les plus matures, cette population reste très mineure pour les souris gata-1-S310A. **En conclusion, les foies fœtaux des souris gata-1-S310A possèdent une population hématopoïétique où tous les stades sont représentés, mais où le pourcentage de progéniteurs est inférieur à celui des souris contrôles. A l'inverse, les derniers stades de différenciation, et en particulier à partir des érythroblastes polychromatophiles, semblent plus représentés. Il semble qu'il y ait un déplacement des populations précoces vers les populations plus matures chez les souris gata-1-S310A.**

Nous avons vu que les foies fœtaux des souris gata-1-S310A contiennent plus de cellules que ceux des contrôles. Si l'on s'intéresse au nombre absolu de cellules contenues dans chaque population hématopoïétique, on constate que le nombre de cellules gata-1-S310A est significativement supérieur au nombre de cellules contrôles dans chaque population (**Figure 28**).

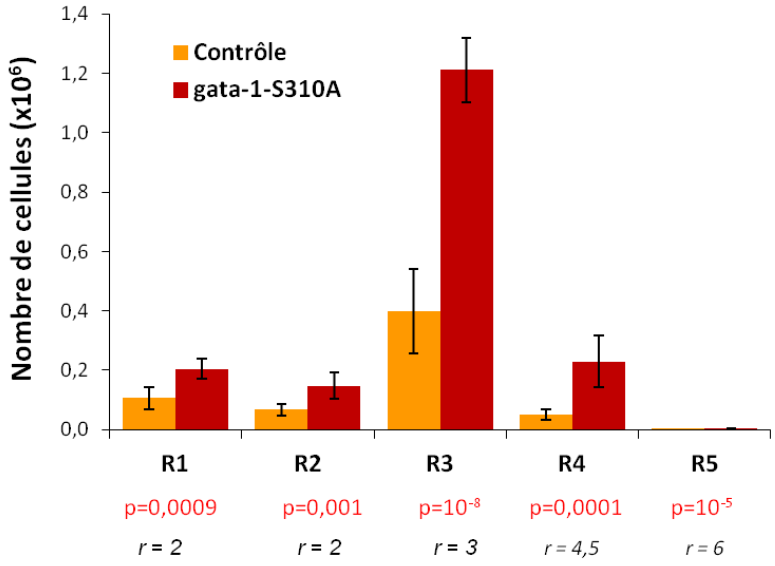


Figure 28 : <u>A E11.5, le nombre de cellules contenues dans chaque population érythroïde est supérieur dans les foies fœtaux gata-1-S310A</u>
Le graphique représente le nombre absolu de cellules contenues dans chaque population, obtenu en rapportant le pourcentage de chaque population à la cellularité totale du foie (cf Fig27) (n=21). Les probabilités (p=) significatives, déterminées par le test de Student, sont indiquées en rouge. Les ratios gata-1-S310A/contrôle sont indiqués (*r*=).

Existe-t-il des différences pour chaque population comme nous l'avons observé en pourcentage ? Pour cela, nous avons calculé les ratios indiqués en italique sous chaque population (*r*=) et correspondant au rapport entre la valeur obtenue pour les souris gata-1-S310A et celle obtenue pour les souris contrôles. Ce ratio nous permet d'évaluer plus précisément les différences entre les souris gata-1-S310A et contrôles pour chaque population. On peut remarquer que ce ratio n'est pas

constant pour toutes les populations et qu'il augmente progressivement en fonction des stades de différenciation : il est de 2 fois pour les progéniteurs (R1) et les proérythroblastes (R2) pour augmenter ensuite au cours des derniers de maturation (3 pour R3 ; 4,5 pour R4 et 6 pour R5). Les foies fœtaux des souris gata-1-S310A semblent donc contenir plus de cellules aux stades les plus matures de l'érythropoïèse. Toutefois, l'évaluation à l'aide des ratios est une approche grossière car le rapport est calculé entre les moyennes et nous n'avons pas accès à la force statistique avec ce genre de calcul. C'est pourquoi nous avons calculé le ratio entre le nombre d'érythroblastes matures (R3+R4) et le nombre de proérythroblastes (R2) pour chaque foie fœtal gata-1-S310A et contrôle. Avec ce calcul, nous avons accès à la fois à une évaluation statistique des différences observées, mais également à une image de la quantité de cellules matures obtenues à partir du pool de proérythroblastes. Les résultats sont présentés dans la **Figure 29**.

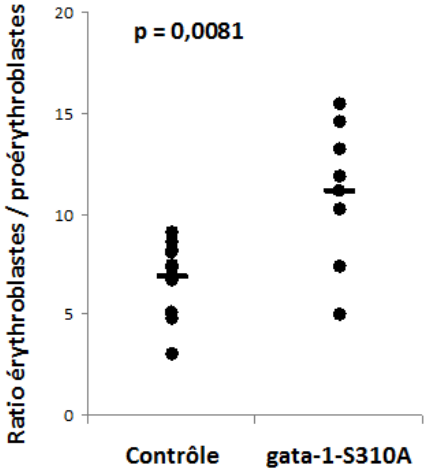


Figure 29 : <u>A E11,5, le ratio érythroblastes/proérythroblastes est supérieur dans les foies fœtaux gata-1-S310A</u>
Le ratio érythroblastes (R3+R4) / proérythroblastes (R2) est calculé pour chaque foie fœtal contrôle et gata-1-S310A à partir du nombre de cellules contenues dans chaque population (cf Figure 28).

Le résultat indique que ce ratio est significativement plus élevé chez les souris gata-1-S310A (p=0,008). Ainsi, à partir d'une même quantité de proérythroblastes, les foies fœtaux des souris gata-1-310A sont capables de produire environ deux fois plus d'érythroblastes matures comparés aux contrôles.

L'augmentation globale de la cellularité du foie fœtal chez les souris gata-1-S310A est non seulement due à une augmentation du nombre de cellules dans chaque population mais également à une augmentation de la capacité de production des stades les plus matures de la différenciation érythroïde.

Nous avons vu que les foies fœtaux des souris gata-1-S310A semblent contenir en pourcentage moins de progéniteurs (stade R1 : CD71-/Ter119-) que leurs équivalents contrôles (10,97% pour les gata-1-S310A versus 16,44% pour les souris contrôles) mais ces progéniteurs semblent produire plus de cellules matures. Afin d'étudier les capacités de différenciation des progéniteurs érythroïdes du foie fœtal, nous avons réalisé un test de clonogénicité. Des études précédentes (Rooke and Orkin, 2006) ont montré que les progéniteurs de foies fœtaux des souris gata-1-S310A étaient identiques à ceux des contrôles. Toutefois, la culture a été effectuée en milieu riche en cytokines. Ces concentrations saturantes peuvent masquer les différences en sur-activant les voies de signalisation. Nous avons donc décidé de cultiver les cellules dans des conditions sous-optimales de culture de manière à révéler une potentielle différence entre les deux types de cellules. Pour cela, nous avons ensemencé 10^5 cellules/puits dans un milieu semi-solide (méthyl-cellulose) contenant de l'insuline, et de l'holotransferrine (nommé M3234), additionné d'Epo (2U/mL) et de SCF (10ng/mL). Cette condition, que nous nommerons « condition optimale », est la même que celle utilisée dans l'étude de Rooke&Orkin et nous servira de contrôle. Les cellules ont également été cultivées en présence de différentes concentrations d'Epo (2 à 0,05 U/mL) mais en absence de SCF (-). Ces conditions seront qualifiées de « condition sous-optimales ». Le nombre de colonies (BFU-e) obtenu est compté 14 jours après la mise en culture. Les résultats sont présentés **Figure 30**. Pour faciliter l'interprétation des résultats, nous avons également indiqué (en blanc) le nombre relatif de colonies issues de cellules de foies fœtaux gata-1-S310A lorsque celui des souris contrôles est arbitrairement fixé à 100.

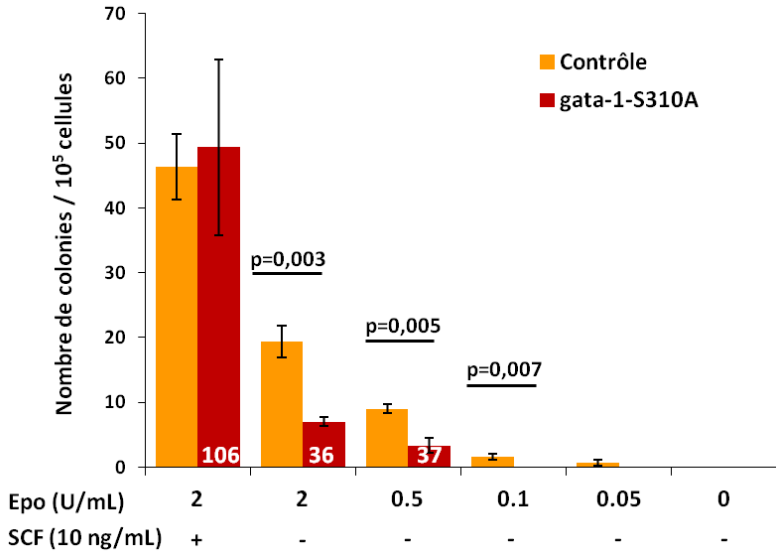


Figure 30 : <u>Les progéniteurs fœtaux gata-1-S310A sont plus sensibles à l'absence de SCF que les contrôles</u>
Les cellules de foies fœtaux contrôles et gata-1-S310A ont été mises en culture (10^5 cellules/puits) dans un milieu semi-solide (méthyl-cellulose) contenant de l'insuline et de la transferrine (M3234) additionné de différentes concentrations d'Epo et de SCF à 10ng/mL ou non (-). Après 14 jours, le nombre de colonies (BFU-e) formées a été déterminé. Le graphique représente les moyennes de trois expériences. Les probabilités (p=) sont déterminées par le test de Student. Le nombre relatif de colonies issues de cellules de foies fœtaux gata-1-S310A lorsque celui des souris contrôles est arbitrairement fixé à 100 est indiqué en blanc.

Pour les conditions de culture optimales, nous obtenons un nombre équivalent de BFU-e pour les deux lignées murines (nombre relatif de 106 versus 100 pour le contrôle, soit 106%) : comme publié précédemment, **dans les conditions optimales de culture, le nombre de colonies obtenues avec les cellules de foies fœtaux gata-1-S310A est équivalent au contrôle**. En culture avec Epo seule, le nombre de colonies issues des deux lignées est fortement diminué par rapport aux conditions optimales. Dans ces conditions sous-optimales, une différence significative s'installe entre les deux lignées : le nombre relatif de colonies issues des foies fœtaux de souris gata-1-S310A est de 36% par rapport au contrôle. Ainsi, il existe une différence entre les progéniteurs gata-1-S310A et les progéniteurs contrôles et cette différence peut être observée dans des conditions sous-optimales de culture. On observe alors que **les progéniteurs gata-1-S310A sont plus sensibles à l'absence de SCF que les contrôles**.

Qu'en est-il de l'effet de l'Epo ? Pour évaluer l'effet de l'Epo sur la différenciation des progéniteurs, nous avons réalisé ensuite, en absence de SCF, une gamme décroissante d'Epo (0,5U/mL – 0,1U/mL – 0,05U/mL – 0U/mL). Pour les deux types de cellules, le nombre de colonies obtenues diminue progressivement avec la quantité d'Epo, avec toujours un nombre de colonies gata-1-S310A inférieur à celui du contrôle. Si l'on compare les différents ratios, on remarque qu'ils sont identiques pour les différentes concentrations d'Epo (36% pour 2U/mL et 37% pour 0.5U/mL). On peut en déduire que la diminution de la quantité d'Epo dans le milieu a le même effet sur la survie des deux types de progéniteurs. Ainsi, **en absence de SCF, les progéniteurs gata-1-S310A et contrôles répondent à l'Epo de façon équivalente**. En conclusion, afin d'observer des différences entre les deux lignées murines, nous devons cultiver les progéniteurs en absence de SCF. Dans ces conditions sous-optimales de culture, les progéniteurs des foies fœtaux de souris gata-1-S310A forment moins de colonies que les équivalents contrôles. Leur sensibilité à l'Epo semble cependant identique à celle des contrôles.

Nous avons également évalué la taille des colonies formées dans les conditions de culture optimales en comptant le nombre de cellules par colonie (**Figure 31**).

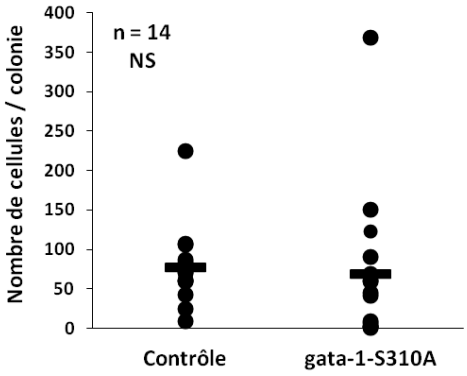


Figure 31 : <u>Le nombre de cellules par colonie est équivalent pour les progéniteurs fœtaux gata-1-S310A et contrôles</u>
Les cellules de foies fœtaux contrôles et gata-1-S310A ont été mises en culture (10^5 cellules/puits) dans un milieu semi-solide (méthyl-cellulose) contenant de l'insuline et de la transferrine (M3234) additionné d'Epo (2U/mL) et de SCF (10ng/mL). Après 14 jours, le nombre de cellules par colonie formée a été compté pour 14 colonies contrôles et 14 colonies gata-1-S310A (n=14). **NS** : non significatif.

En moyenne, le nombre de cellules par colonies est équivalent pour les cellules gata-1-S310A et les contrôles. **Les progéniteurs gata-1-S310A et contrôles semblent avoir une capacité de différenciation identique**.

L'insuline et l'holotransferrine étant également des facteurs stimulants puissants de l'érythropoïèse (Coulon et al., 2011; Miyagawa et al., 2000), quel serait le comportement des progéniteurs gata-1-S310A en leur absence ? Pour répondre à cette question, les cellules ont été ensemencées dans un milieu semi-solide ne contenant ni insuline ni holotransferrine (nommé M3231), dans les conditions optimales (2U/mL d'Epo et 10ng/mL de SCF) et sous-optimales de culture (Epo 2U/mL). Le nombre de colonies (BFU-e) a été évalué 14 jours après la mise en culture et le nombre de cellules a été compté. Les résultats sont présentés **Figure 32**.

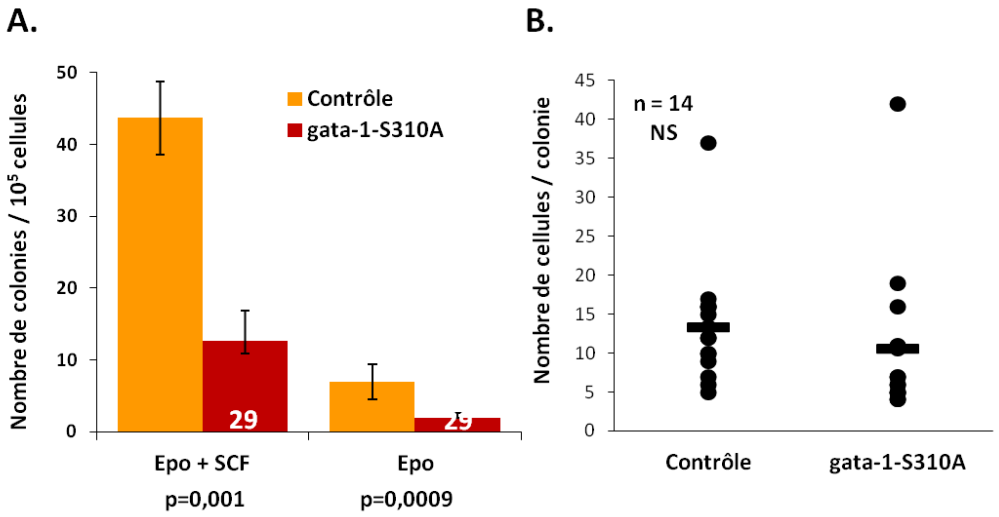


Figure 32 : <u>La capacité clonogénique des BFU-e de foie fœtal gata-1-S310A est dépendante de la présence d'insuline et d'holotransferrine dans le milieu</u>

Les cellules de foies fœtaux contrôles et gata-1-S310A ont été mises en culture (10^5 cellules/puits) dans un milieu semi-solide (méthyl-cellulose) sans insuline ni transferrine (M3231) additionné d'Epo (2U/mL) et de SCF (10ng/mL) ou d'Epo seule (2U/mL). **A.** Après 14 jours, le nombre de colonies (BFU-e) formées a été déterminé. Le graphique représente les moyennes de trois expériences. Les probabilités (p=) sont déterminées par le test de Student. Le nombre relatif de colonies issues de cellules de foies fœtaux gata-1-S310A lorsque celui des souris contrôles est arbitrairement fixé à 100 est indiqué en blanc. **B.** Le nombre de cellules par colonies formées en présence d'Epo+SCF a été déterminé pour 14 colonies de chaque génotype (n=14). **NS** : non significatif.

En présence d'Epo et de SCF, on obtient un grand nombre de colonies pour les cellules contrôles. On peut remarquer que ce chiffre est équivalent à celui obtenu précédemment dans le milieu de culture M3234 contenant de l'insuline et de l'holotransferrine (**Figure 30**) : en présence d'Epo et de SCF, l'insuline et l'holotransferrine ne semblent pas avoir d'effet sur la capacité des progéniteurs érythroïdes contrôles à former des colonies. Par contre, le nombre de colonies gata-1-S310A obtenues est significativement inférieur à celui des contrôles : le ratio est de 29% du contrôle. **La capacité clonogénique des BFU-e gata-1-S310A est donc dépendante de la présence d'insuline et d'holotransferrine dans le milieu**.

En présence d'Epo seule, le nombre de colonies gata-1-S310A et contrôles diminue fortement et de manière parallèle comme le montre le ratio de 29% (**Figure 32A**). Ainsi, l'absence de SCF ne semble pas impacter les capacités clonogéniques des cellules gata-1-S310A par rapport au contrôle : **en absence d'insuline et d'holotransferrine, l'effet du SCF sur la clonogénicité des BFU-e est équivalent sur les deux lignées**. Ainsi, au vu de ces résultats et des résultats précédents, si on hiérarchise les différents facteurs, l'effet de l'insuline et/ou de l'holotransferrine sur les progéniteurs semble donc dominant sur l'effet du SCF et de l'Epo.

Le nombre de cellules par colonies obtenues en présence d'Epo et de SCF a été compté pour chacun des génotypes (**Figure 32B**). En absence d'insuline et de transferrine, les colonies contrôles et gata-1-S310A contiennent un nombre de cellules équivalent. Ce chiffre est tout de même inférieur à

celui obtenu dans les conditions optimales de culture (**Figure 31**). **L'insuline et la transferrine semblent donc avoir un rôle majeur sur la capacité des BFU-e gata-1-S310A à former des colonies mais pas sur le nombre de cellules formant ces colonies.**

En conclusion, l'analyse de l'érythropoïèse fœtale à un stade précoce du développement embryonnaire (E11.5) a permis de mettre en évidence chez les souris gata-1-S310A par rapport aux souris contrôles :

- **une augmentation globale du nombre de cellules érythroïdes ;**
- **une augmentation du ratio cellules matures (érythroblastes) / cellules précoces (proérythroblastes) ;**
- **une plus forte sensibilité des progéniteurs érythroïdes gata-1-S310A à l'insuline, l'holotransferrine et au SCF. L'effet de l'insuline+transferrine est dominant sur l'effet du SCF.**

Trouverons-nous ces mêmes éléments dans l'érythropoïèse adulte?

2. L'érythropoïèse adulte des souris gata-1-S310A est-elle équivalente à celle des souris contrôle ?

Afin d'évaluer l'impact de la phosphorylation de GATA-1 sur l'érythropoïèse adulte, nous avons étudié d'une part les cellules circulantes en mesurant les paramètres sanguins et la durée de vie des globules rouges, d'autre part la production érythrocytaire par l'analyse des cellules érythroïdes médullaires et spléniques.

2.1. Les globules rouges gata-1-S310A sont-ils équivalents aux contrôles ?

Nous avons analysé les paramètres sanguins des souris gata-1-S310A et contrôles (**Fig33A**). Comme publié précédemment par l'équipe de S.H. Orkin, **nous n'observons aucune différence significative entre les valeurs mesurées chez les individus gata-1-S310A et les contrôles**. Le pourcentage de réticulocytes a également été mesuré en cytométrie de flux par un marquage au Thiazole Orange (**Fig33B**) : le nombre de réticulocytes est équivalent entre les souris gata-1-S310A et contrôle.

A.

	n =	GR (10^9/mL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	VGM (fL)	TCMH (pg)	CCMH (g/dL)
Contrôle	9	9,29 *(1,06)*	13,00 *(1,60)*	39,16 *(4,81)*	41,99 *(1,14)*	13,96 *(0,30)*	33,31 *(0,74)*
gata-1-S310A	17	9,60 *(0,75)*	13,71 *(0,98)*	40,64 *(3,48)*	42,31 *(0,76)*	14,33 *(0,34)*	33,90 *(0,76)*

B.

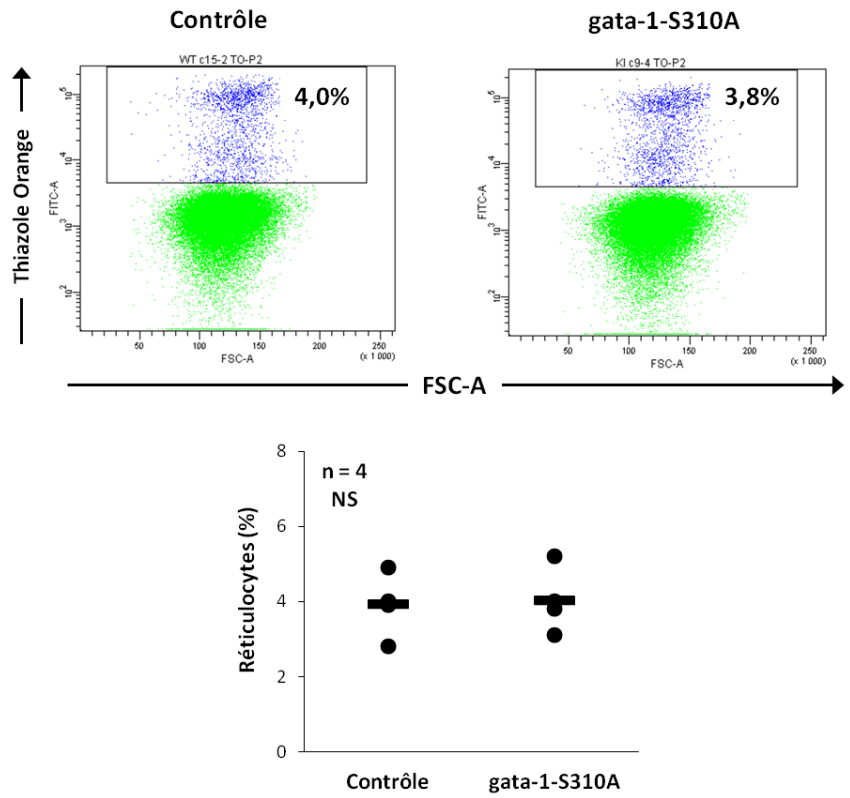


Figure 33 : <u>Les paramètres sanguins des souris gata-1-S310A sont équivalents aux contrôles</u>
A. Les paramètres sanguins sont mesurés par un automate (Médonic CA620). Les moyennes des valeurs obtenues pour les souris contrôle et gata-1-S310A sont indiquées dans le tableau. Pour chaque moyenne, l'écart moyen est indiqué en italique entre parenthèses. **B.** Le pourcentage de réticulocytes circulants a été déterminé par cytométrie en flux par un marquage au Thiazole Orange. Deux images représentatives sont présentées. L'ensemble des valeurs obtenues pour quatre individus de chaque génotype (n=4) est représenté dans le graphique. **GR** : Globules Rouges ; **HGB** : Hémoglobine ; **HCT** : Hématocrite ; **VGM** : Volume Globulaire Moyen ; **TCMH** : Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine ; **CCMH** : Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine.

Nous avons observé au cours de l'érythropoïèse fœtale une augmentation de la production érythrocytaire chez les souris gata-1-S310A. Pourtant, les paramètres sanguins de ces souris, en particulier le nombre de globules rouges, sont normaux. Toutefois, le nombre de globules rouges circulant est le résultat de l'équilibre entre la production et la destruction des globules rouges. Nous avons alors souhaité mesurer la durée de vie des globules rouges. Pour cela, les globules rouges ont été marqués *in vivo* par injection d'une solution de NHS-biotine (N-hydrosuccinimide couplé à la biotine) par voie intraveineuse. La NHS-biotine va fixer les protéines membranaires des cellules sanguines. Les cellules ainsi marquées seront ensuite détectées en cytométrie de flux grâce à un

fluorochrome couplé à la streptavidine. On distinguera les érythrocytes par un marquage Ter119. Ainsi, les érythrocytes biotinylés sont les cellules Ter119+/streptavidine+ (**Fig34A**). Après injection, des prélèvements sanguins sont effectués régulièrement. A J0, la valeur obtenue correspond à 100% de marquage. La disparition du marquage NHS-biotine reflète la clairance des globules rouges marqués à J0. On définit la durée de vie comme le temps nécessaire à la disparition complète du marquage. Les résultats obtenus sont présentés **Figure 34B**.

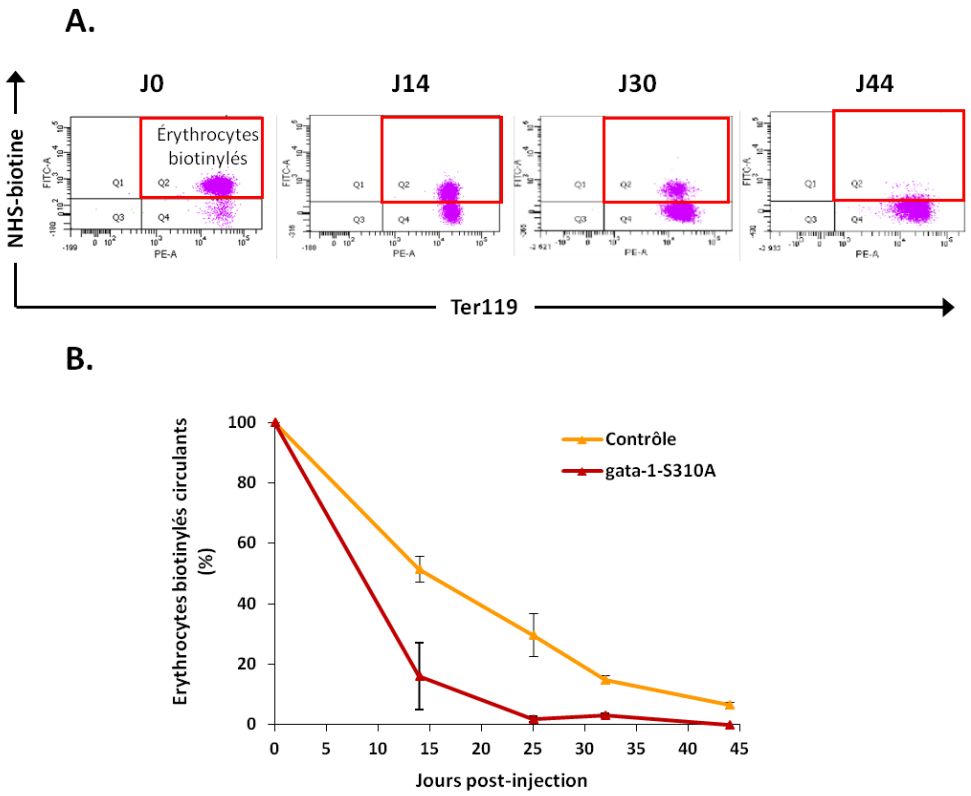


Figure 34 : <u>La durée de vie des globules rouges gata-1-S310A est plus courte que celle des contrôles</u>
Les globules rouges sont marqués *in vivo* par injection d'une solution de NHS-biotine (N-hydrosuccinimide-biotine – 50mg/kg) à J0 par voie intraveineuse dans 4 souris contrôle et 4 souris gata-1-S310A (n=4). **A.** Des prélèvements sanguins sont réalisés régulièrement. Les cellules biotinylées sont détectées par un fluorochrome (FITC) couplé à la streptavidine. Le pourcentage d'érythrocytes biotinylés est défini comme le pourcentage de cellules Ter119-PE+/streptavidine-FITC+ (rectangle rouge). **B.** Pour chaque individu, les valeurs obtenues à chaque prélèvement sont rapportées à la valeur à J0 qui est fixée à 100%. Les moyennes des valeurs obtenues sont représentées dans le graphique.

Chez la souris, la durée de vie moyenne des globules rouges est d'environ 40 jours. Comme le montre la **figure 34B**, chez les souris contrôles, le taux d'érythrocytes biotinylés diminue progressivement. A J44, il reste environ 6% de globules rouges marqués. Par contre, chez les souris gata-1-S310A, le taux d'érythrocytes marqués diminue plus rapidement. A J14, il est 3 fois moins élevé que celui des contrôles (16% vs 51%). Vingt-cinq jours après le marquage, il ne reste que 1,6% de globules rouges marqués. La clairance des érythrocytes gata-1-S310A est donc deux fois plus rapide que celles des contrôles.

Ainsi, malgré des paramètres sanguins normaux, les globules rouges des souris gata-1-S310A ont une durée de vie deux fois plus courte que celle des globules rouges contrôles.

L'absence de phosphorylation de GATA-1 diminue la durée de vie des globules rouges. Nous pouvons supposer qu'elle induit une fragilité de la cellule ou des défauts morphologiques qui conduisent à la destruction prématurée des érythrocytes.

L'augmentation de la production érythrocytaire permettrait-elle de compenser la perte excessive de globules rouges ? Pour répondre à cette question, nous avons étudié les différents sites de production des globules rouges.

2.2. La production érythrocytaire des souris gata-1-S310A adultes est-elle équivalente à celle des contrôles ?

Nous avons observé au cours de l'érythropoïèse fœtale des souris gata-1-S310A une augmentation de la production érythrocytaire et une dépendance des progéniteurs érythroïdes précoces à l'insuline, la transferrine et au SCF. Ces caractéristiques sont-elles retrouvées chez l'adulte ?

Pour répondre à cette question, nous avons analysé les différentes populations de progéniteurs érythroïdes médullaires et spléniques par les marqueurs CD71 et Ter119. L'analyse des progéniteurs médullaires permet d'étudier l'érythropoïèse physiologique, tandis que les progéniteurs de la rate permettent l'analyse de l'érythropoïèse de stress. Les résultats sont présentés **Figure 35**.

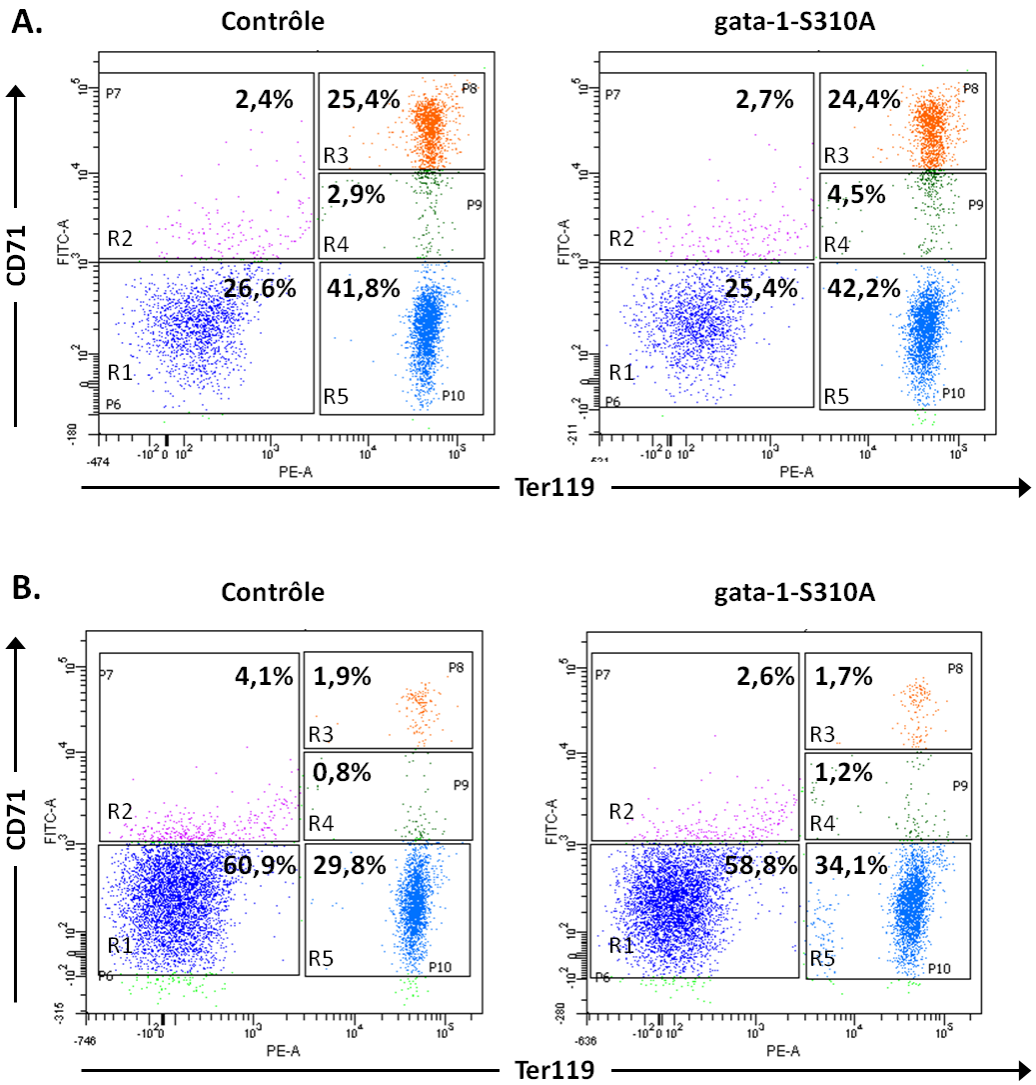


Figure 35 : <u>La production érythrocytaire des souris gata-1-S310A adultes est équivalente aux contrôles</u>
A. Les cellules de moelle de souris contrôles et gata-1-S310A ont été prélevées puis analysées par cytométrie flux. **B.** La rate de souris contrôle et gata-1-S310A a été prélevée, dissociée, et les cellules ont été analysées en cytométrie.
Les deux types de cellules ont été marqués par les anticorps CD71-FITC et Ter119-PE. Les pourcentages des différentes populations (R1-R5) sont indiqués. **R1** : progéniteurs précoces ; **R2** : proérythroblastes ; **R3** : érythroblastes basophiles ; **R4** : érythroblastes polychromatophiles et acidophiles ; **R5** : réticulocytes.

Dans la moelle (**Fig35A**), on observe que les différentes populations de progéniteurs érythroïdes sont représentées de façon équivalente chez les souris gata-1-S310A et contrôles. **L'érythropoïèse physiologique ne semble pas être modifiée**. Dans la rate (**Fig35B**), nous n'observons pas non plus de différence significative dans les proportions des progéniteurs gata-1-S310A et contrôles. On peut noter dans les deux cas une faible proportion d'érythroblastes (R3-R4), due au fait qu'en conditions physiologiques normales, la rate est un organe érythroïde secondaire. Nous pouvons alors en déduire que **les souris gata-1-S310A ne présentent pas d'activation de l'érythropoïèse de stress**.

Nous avons ensuite réalisé un test clonogénique afin d'évaluer la capacité de différenciation des progéniteurs précoces de la moelle osseuse. Ce test a été réalisé dans les mêmes conditions de culture que précédemment (**cf Figure 30**). 10^5 cellules ont été ensemencées dans un milieu semi-solide et les colonies (BFU-e) obtenues ont été comptées après 14 jours (**Fig36A**). Le nombre de cellules contenu dans chaque colonie a été compté (**Fig36B**).

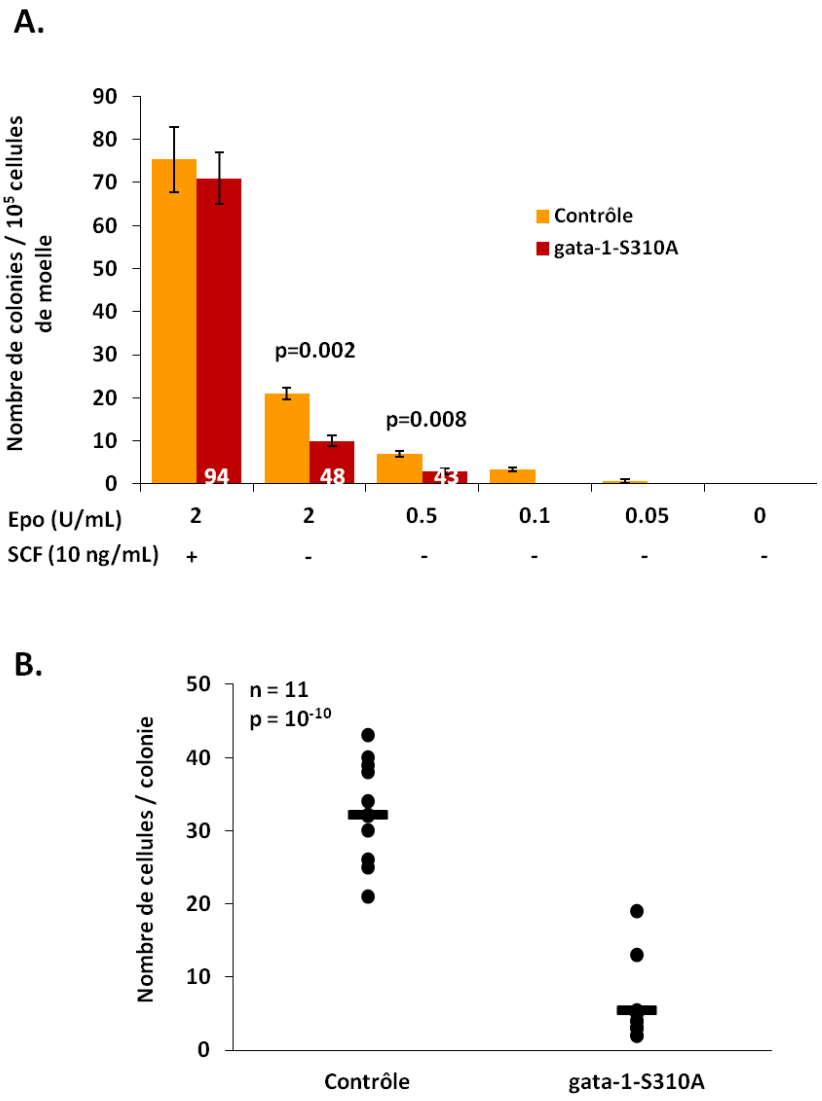


Figure 36 : <u>Les progéniteurs adultes gata-1-S310A sont plus sensibles à l'absence de SCF et forment des colonies plus petites que les contrôles</u>

Les cellules de moelle contrôles et gata-1-S310A ont été mises en culture (10^5 cellules/puits) dans un milieu semi-solide (méthyl-cellulose) contenant de l'insuline et de la transferrine (M3234) additionné de différentes concentrations d'Epo et de SCF à 10ng/mL ou non (-). **A.** Après 14 jours, le nombre de colonies (BFU-e) formées a été déterminé. Le graphique représente les moyennes de trois expériences. Le nombre relatif de colonies issues de cellules de moelle gata-1-S310A lorsque celui des souris contrôles est arbitrairement fixé à 100 est indiqué en blanc. **B.** Le nombre de cellules par colonie formée en Epo+SCF a été compté pour 11 colonies contrôles et 11 colonies gata-1-S310A (n=11).
Les probabilités (p=) sont déterminées par le test de Student.

Dans les conditions de culture optimales, en présence d'insuline, d'holotransferrine, d'Epo (2U/mL) et de SCF (10ng/mL), le nombre de colonies obtenues à partir des BFU-e gata-1-S310A est équivalent à celui obtenu à partir des cellules contrôles (**Fig36A**). Cependant, dans ces conditions, les colonies gata-1-S310A contiennent 6 fois moins de cellules que les colonies contrôles (**Fig36B**). **Les progéniteurs érythroïdes gata-1-S310A ont une capacité de prolifération altérée**.

En absence de SCF, on observe une diminution du nombre de colonies contrôles et gata-1-S310A, mais elle est plus marquée pour les gata-1-S310A (**Fig36A**). En effet, on observe une diminution significative du ratio entre contrôles et gata-1-S310A en absence de SCF (94% vs 48%). **Les progéniteurs médullaires gata-1-S310A sont plus dépendants du SCF que les contrôles**.

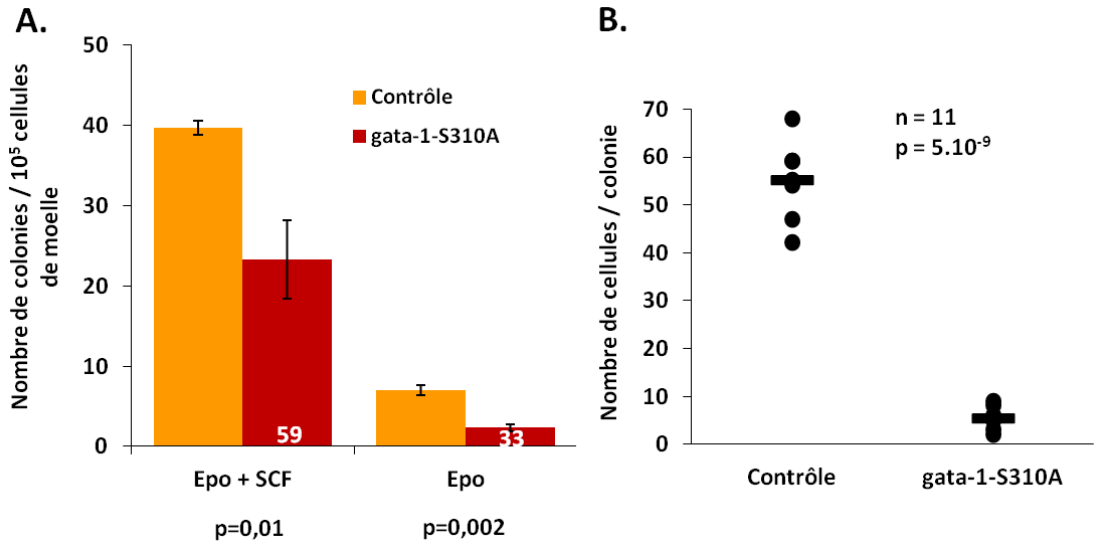


Figure 37 : <u>La capacité clonogénique des BFU-e de moelle gata-1-S310A est dépendante de la présence d'insuline et d'holotransferrine dans le milieu</u>

Les cellules de moelle contrôles et gata-1-S310A ont été mises en culture (10^5 cellules/puits) dans un milieu semi-solide (méthyl-cellulose) sans insuline ni transferrine (M3231) additionné d'Epo (2U/mL) et de SCF (10ng/mL) ou d'Epo seule (2U/mL). **A.** Après 14 jours, le nombre de colonies (BFU-e) formées a été déterminé. Le graphique représente les moyennes de trois expériences. Le nombre relatif de colonies issues de cellules de moelle gata-1-S310A lorsque celui des souris contrôles est arbitrairement fixé à 100 est indiqué en blanc. **B.** Le nombre de cellules par colonies formées en présence d'Epo+SCF a été déterminé pour 11 colonies de chaque génotype (n=11).
Les probabilités (p=) sont déterminées par le test de Student.

Si l'on s'intéresse à l'effet de l'insuline/transferrine sur les progéniteurs de moelle, nous pouvons constater qu'en absence d'insuline et de transferrine et en présence d'Epo et de SCF, le nombre de colonies formées par les progéniteurs gata-1-S310A est significativement inférieur à celui obtenu avec les progéniteurs contrôles (**Fig36A**). **La capacité clonogénique des progéniteurs gata-1-S310A est plus dépendante de l'insuline/transferrine que celle des contrôles**. Comme précédemment, les colonies gata-1-S310A contiennent 6 fois moins de cellules que les colonies contrôles (**Fig36B**).

Lorsque l'on enlève le SCF, on observe une diminution du nombre de colonies plus importante pour les progéniteurs gata-1-S310A. En effet, le nombre relatif de colonies gata-1-S310A par rapport

au contrôle passe de 59 à 33. **En absence d'insuline/transferrine, les progéniteurs médullaires gata-1-S310A ont également une dépendance plus forte au SCF que les contrôles**.

On ne retrouve pas dans l'érythropoïèse adulte des souris gata-1-S310A l'accélération de la différenciation érythroïde observée au cours de l'érythropoïèse fœtale. L'érythropoïèse médullaire ne semble pas affectée par l'absence de phosphorylation de GATA-1. Par contre, on observe chez l'adulte la même dépendance des progéniteurs gata-1-S310A à l'insuline/transferrine et au SCF que dans le foie fœtal.

L'insuline et/ou la transferrine semblent donc jouer un rôle important dans la différenciation des progéniteurs érythroïdes gata-1-S310A.

2.3. Quel est le rôle de l'insuline/IGF-1 et de la transferrine dans l'érythropoïèse des souris gata-1-S310A ?

D'après les résultats des études clonogéniques réalisées avec les progéniteurs de foie fœtal et les progéniteurs médullaires adultes, il semble que l'insuline et/ou la transferrine jouent un rôle important dans la différenciation érythroïde des cellules gata-1-S310A. Pour déterminer lequel de ces deux facteurs est nécessaire à la différenciation des cellules gata-1-S310A, nous avons réalisé une étude clonogénique à partir de progéniteurs médullaires en utilisant le milieu M3231 supplémenté en Epo et SCF, et additioné ou non d'insuline, d'holotransferrine ou des deux. Nous avons également testé l'effet de l'IGF-1 (Insulin-Like Growth Factor 1), un facteur fortement homologue à l'insuline qui a été impliqué dans l'érythropoïèse (Ratajczak et al., 1998; Miyagawa et al., 2000). Les résultats sont présentés **Figure 38**.

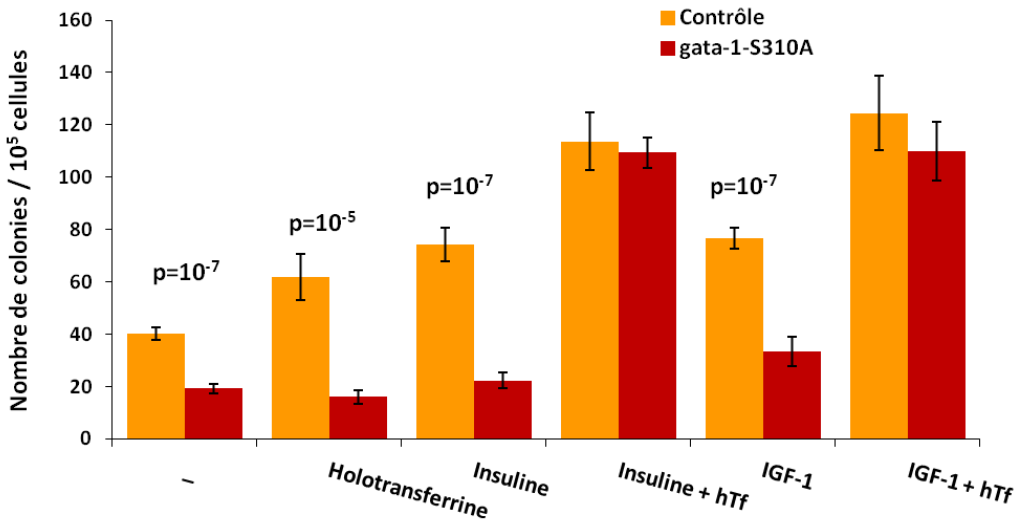


Figure 38 : <u>Les progéniteurs médullaires gata-1-S310A nécessitent la présence d'insuline/IGF-1 et d'holotransferrine pour former des colonies</u>
10^5 cellules de moelle de souris contrôles et gata-1-S310A ont été mises en culture dans un milieu semi-solide (M3231) supplémenté en Epo (2U/mL) + SCF (10ng/mL), et additionné ou non (-) d'insuline ou d'IGF-1 et/ou d'holotransferrine (200µg/mL). Le nombre de colonies a été compté à J14. Les probabilités (p=) sont déterminées par le test de Student. **hTf** : holotransferrine.

Comme nous l'avons montré précédemment, en absence d'insuline et de transferrine (-), les cellules gata-1-S310A produisent moins de colonies que les cellules contrôles. L'ajout d'insuline ou d'holotransferrine seules semble augmenter le nombre de colonies formées par les cellules contrôles mais n'a aucun effet sur les cellules gata-1-S310A. **L'insuline ou l'holotransferrine seules augmentent la capacité clonogénique des progéniteurs contrôles mais pas des gata-1-S310A**.

Par contre, l'ajout des deux facteurs simultanément restaure la quantité de colonies formées par les cellules gata-1-S310A à un niveau équivalent aux cellules contrôles. **Il semble donc que les deux facteurs soient nécessaires à la survie et la différenciation érythroïde des progéniteurs gata-1-S310A.**

Par ailleurs, l'ajout d'IGF-1 seul augmente le nombre de colonies produites par les cellules contrôles mais pas celui des cellules gata-1-S310A. Mais la combinaison IGF-1 + holotransferrine rétablit le nombre de colonies des cellules gata-1-S310A au même niveau que celui des cellules contrôles. **L'IGF-1 a donc un effet équivalent à celui de l'insuline sur les progéniteurs érythroïdes gata-1-S310A et contrôles.**

Ces résultats indiquent que l'insuline et/ou l'IGF-1 ainsi que la transferrine jouent un rôle important dans la différenciation des progéniteurs érythroïdes des souris gata-1-S310A.

Si c'est le cas, les souris gata-1-S310A devraient produire une plus grande quantité d'IGF-1. Nous avons alors mesuré le taux sérique d'IGF-1 de souris contrôles et gata-1-S310A. Pour cela, des prélèvements sanguins ont été réalisés sur des souris mâles (12 semaines) et femelles (20 semaines) des deux génotypes. Le sérum a été récupéré par centrifugation et le taux d'IGF-1 a été déterminé à l'aide d'un test ELISA. Les résultats sont présentés **Figure 39**.Dans les deux cas, **le taux sérique d'IGF-1 des souris gata-1-S310A est significativement supérieur à celui des souris contrôles.**

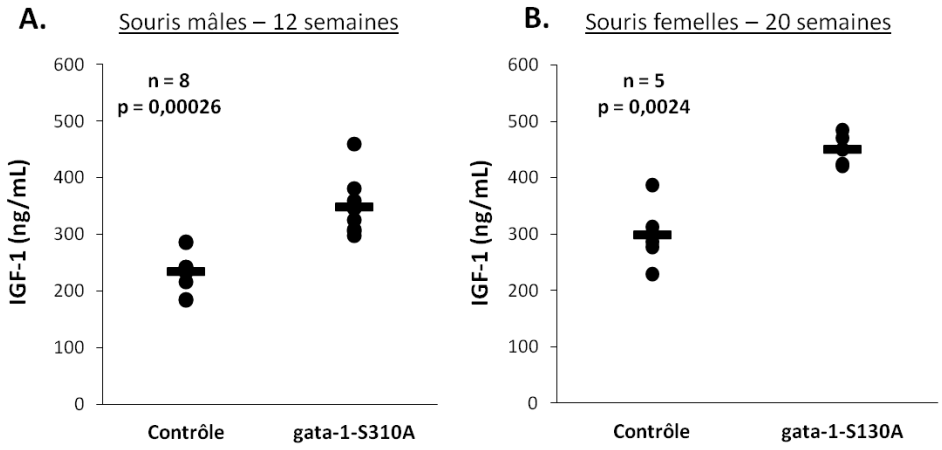


Figure 39 : Le taux sérique d'IGF-1 des souris gata-1-S310A est supérieur à celui des contrôles
Des prélèvements sanguins ont été réalisés sur des souris contrôles et gata-1-S310A mâles âgés de 12 semaines et femelles âgées de 20 semaines. Le sérum a été récupéré par centrifugation. Le taux d'IGF-1 sérique a été mesuré à l'aide d'un test ELISA (Quantikine ELISA Kit – R&D Systems). Le nombre d'individus testés est indiqué sur chaque graphique. La probabilité (p=) a été déterminée par le test de Student.

En conclusion, l'analyse de l'érythropoïèse adulte des souris gata-1-S310A montre que :

- **Les paramètres sanguins sont normaux, et le taux de réticulocytes est normal ;**
- **Les proportions des populations érythroïdes médullaires et spléniques semblent normales ;**
- **La proportion de progéniteurs érythroïdes médullaires est normale ;**

Par contre :

- **La durée de vie des globules rouges gata-1-S310A est deux fois plus courte que celle des contrôles, indiquant une destruction prématurée des érythrocytes ;**
- **Comme dans le foie fœtal, les progéniteurs érythroïdes de la moelle des souris gata-1-S310A sont plus dépendants de l'insuline/IGF-1 et de la transferrine que les contrôles ;**
- **Le taux sérique d'IGF-1 est augmenté chez les souris gata-1-S310A.**

Ces deux derniers éléments permettent de supposer qu'un des mécanismes de compensation mis en place chez les souris gata-1-S310A serait une sensibilité accrue à l'Insuline/IGF-1. Dans la suite de mon travail, je me suis intéressée à l'implication de cette voie au cours de l'érythropoïèse adulte des souris gata-1-S310A.

3. Quel est le rôle de la voie IGF-1 dans l'érythropoïèse des souris gata-1-S310A ?

3.1. Approche expérimentale

Nous avons montré que l'érythropoïèse des souris gata-1-S310A semble plus sensible à l'IGF-1 ou à l'insuline, et à l'holotransferrine. Nous avons choisi d'étudier le rôle de l'IGF-1. En effet, nous avons observé que le taux sérique d'IGF-1 était plus élevé chez les souris gata-1-S310A adultes. De plus, la voie de l'IGF-1 a été décrite comme étant fortement activée dans des modèles murins exprimant la forme courte de GATA-1 ne pouvant plus lier pRb (Klusmann et al., 2010).

Pour étudier le rôle de la voie IGF-1 dans l'érythropoïèse des souris gata-1-S310A, nous avons choisi une approche utilisant un inhibiteur chimique. L'IGF-1 étant essentiel au développement embryonnaire (Liu et al., 1993), nous avons étudié l'érythropoïèse adulte. Pour cela, nous avons utilisé un inhibiteur du récepteur à l'IGF-1 (IGF-1R) : la picropodophylline (PPP). La PPP inhibe l'autophosphorylation et la signalisation en aval du récepteur à l'IGF-1. La picropodophylline induit également la down-régulation et la dégradation du récepteur. En injection chez la souris, son effet est réversible et peu toxique. Elle est spécifique de l'IGF-1R et a très peu d'effet sur les autres récepteurs en particulier le récepteur à l'Insuline (Girnita et al., 2004; Hofmann and García-Echeverría, 2005). Chez la souris, cette molécule a un fort effet anti-tumoral sur différents types de tumeurs tels que les myélomes multiples (Strömberg et al., 2006), le mélanome uvéal (Girnita et al., 2006) ou le glioblastome (Yin et al., 2010).

Pour notre étude, deux cohortes constituées de quatre souris contrôles et quatre souris gata-1-S310A, âgées de 12 semaines, ont été définies : l'une a été traitée au PPP à raison de 10mg/kg/12h pendant 20 jours, tandis que l'autre a reçu du DMSO 5% selon le même protocole (**Figure 40**).

Les quatre groupes de souris sont dénommés :

- Contrôle/DMSO (n=4)
- gata-1-S310A/DMSO (n=4)
- Contrôle/PPP (n=4)
- gata-1-S310A/PPP (n=4)

Les paramètres sanguins (NFS) des souris ont été mesurés au début du traitement (J0). Une première analyse sanguine (NFS et frottis) a été réalisée à J12. Nous avons interrompu le protocole à J21 car les souris de la cohorte gata-1-S310A présentaient des signes évidents d'épuisement et une

forte hypothermie. Les souris ont alors été sacrifiées et l'analyse complète de l'érythropoïèse a été effectuée.

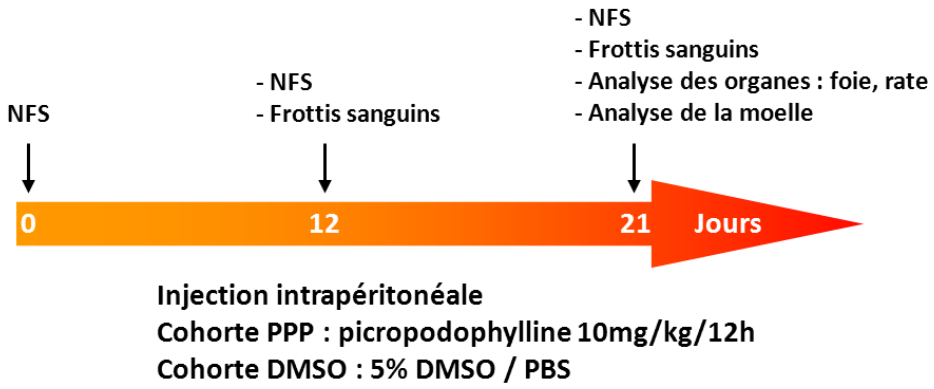


Figure 40 : Inhibition de la voie IGF-1 chez des souris adultes – Protocole expérimental
Quatre souris contrôles et quatre souris gata-1-S310A ont reçu, par injection intrapéritonéale, 10mg/kg/12h de Picropodophylline (Cohorte PPP) ou 200µL d'une solution de PBS/DMSO-5% (Cohorte DMSO) pendant 20 jours. Les paramètres sanguins (NFS) ont été mesurés à J0, J12 et J21. Des frottis sanguins ont été réalisés à J12 et J21. Les souris ont été sacrifiées à J21 pour effectuer une analyse complète de l'érythropoïèse (moelle, rate, foie).

3.2. L'inhibition de la voie IGF-1 induit une anémie chez les souris gata-1-S310A

12 jours après le début du traitement, une première analyse des paramètres sanguins a été effectuée. Aucune différence entre les cohortes n'a été observée : les individus des quatre groupes présentaient des constantes normales, identiques à celles mesurées au début du traitement (J0).

A J21, nous avons observé des différences chez les individus traités au PPP par rapport à la cohorte DMSO. Les résultats sont présentés **Figure 41**.

	GR (10^9/mL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	VGM (fL)	TCMH (pg)	CCMH (g/dL)
Contrôle / DMSO	**9,77** *0,24*	**13,77** *0,44*	**40,3** *1,06*	**41,2** *0,22*	**14,07** *0,11*	**34,20** *0,20*
gata-1-S310A / DMSO	**9,99** *0,49*	**14,43** *0,91*	**41,93** *2,64*	**41,90** *0,53*	**14,43** *0,22*	**34,47** *0,29*
Contrôle / PPP	**11,02** *0,15^{a}*	**15,73** *0,07^{a}*	**47,73** *0,52^{a}*	**43,25** *0,12^{a}*	**14,25** *0,15*	**33,00** *0,21*
gata-1-S310A / PPP	**5,09** *0,12^{a,b}*	**18,93** *0,77^{a,b}*	**19,55** *0,41^{a,b}*	**38,45** *0,11^{a,b}*	**37,23** *0,67^{a,b}*	**96,70** *2,00^{a,b}*

Figure 41 : Les paramètres sanguins de la cohorte PPP sont significativement différents de ceux de la cohorte DMSO
A J21, les paramètres sanguins des quatre groupes de souris ont été mesurés. Les moyennes des valeurs obtenues pour les quatre individus de chaque groupe sont indiquées. Pour chaque moyenne, l'écart moyen est indiqué en italique. **GR** : Globules Rouges ; **HGB** : Hémoglobine ; **HCT** : Hématocrite ; **VGM** : Volume Globulaire Moyen ; **TCMH** : Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine ; **CCMH** : Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine ; ***a*** : significatif ($p < 0,01$) par rapport à la valeur obtenue pour la cohorte correspondante DMSO ; ***b*** : significatif ($p < 0,01$) par rapport à la valeur obtenue pour la cohorte contrôle PPP.

Tout d'abord, on peut noter une légère augmentation du nombre de globules rouges (GR), du taux d'hémoglobine (HGB), de l'hématocrite (HCT) et du volume globulaire moyen (VGM) chez les souris contrôles traitées au PPP par rapport aux contrôles/DMSO.

Chez les souris gata-1-S310A traitées au PPP, on obtient des valeurs significativement différentes de celles obtenues chez les souris gata-1-S310A/DMSO (*a*) et chez les contrôle/PPP (*b*). Les différences observées sont bien dues à l'effet du PPP combiné à la présence de la mutation gata-1-S310A. Chez les souris gata-1-S310A/PPP, on observe une diminution de 50% par rapport aux contrôle/PPP du nombre de globules rouges ($5{,}09.10^9$ versus $11{,}02.10^9$ cellules/mL pour les contrôle/PPP) et de l'hématocrite (19,55% versus 47,73% pour les contrôle/PPP). Ces deux éléments indiquent la présence d'une **anémie chez les souris gata-1-S310A/PPP**. Celle-ci peut être due à une diminution de la production érythrocytaire (anémie arégénérative) ou à une augmentation de la destruction ou de la mort des globules rouges (anémie régénérative). On observe également une augmentation du taux d'hémoglobine (HGB). Par ailleurs, le volume globulaire moyen (VGM) est diminué chez les souris gata-1-S310A/PPP par rapport aux contrôle/PPP. Cela indique une **anomalie morphologique** qui peut être une anomalie de taille (microcytose) ou de forme. La quantité d'hémoglobine par globule rouge (TCMH) ainsi que la concentration d'hémoglobine par globule rouge (CCMH) sont toutes deux fortement augmentées chez les souris gata-1-S310A/PPP par rapport aux contrôle/PPP. Cependant, ces deux valeurs sont calculées par l'automate en fonction de la mesure du taux d'hémoglobine et du nombre de globules rouges. L'augmentation observée ne reflète peut-être pas de réelles modifications physiologiques.

Si les analyses sanguines n'ont pas été très informatives à J12, elles révèlent à J21 une forte diminution du nombre de globules rouges et de l'hématocrite chez tous les individus de la cohorte gata-1-S310A/PPP par rapport aux cohortes nous servant de contrôles (contrôle/PPP et gata-1-S310A/DMSO). Cette anémie pourrait être à l'origine de la détérioration de l'état des souris de cette cohorte à la fin du traitement et révèle un rôle majeur de la voie IGF-1 chez les souris gata-1-S310A.

D'autres paramètres sanguins sont également modifiés chez les individus de la cohorte gata-1-S310A/PPP et apportent différentes questions :

- la morphologie des globules rouges est-elle modifiée chez les souris gata-1-S310A/PPP ?

- les valeurs reflétant la teneur en hémoglobine des globules rouges (HCT, HGB, TCMH et CCMH) étant significativement différentes de celles des souris contrôle/PPP, quel est l'état de l'hémoglobine chez les souris gata-1-S310A/PPP ?

- le taux de globules rouges étant nettement diminué, nous avons conclu à une anémie. Mais est-elle régénérative (destruction des globules rouges augmentée) ou arégénérative (production des globules rouges diminuée) ?

Dans la suite de ce paragraphe, nous allons reprendre ces questions une à une et les documenter par des techniques complémentaires.

3.3. La morphologie des globules rouges des souris gata-1-S310A semble être modifiée après inhibition de la voie IGF-1 :

L'analyse sanguine a révélé la possibilité d'un changement morphologique des globules rouges chez les individus gata-1-S310A/PPP. En effet, le volume globulaire moyen (VGM) est diminué chez les souris gata-1-S310A/PPP par rapport aux contrôle/PPP. Cette modification était peut-être déjà présente dès J12 mais n'a pas été détectée par l'automate d'analyse. Afin de visualiser la morphologie des globules rouges, nous avons réalisé des frottis à J12 et J21. Ces frottis ont été analysés à la fois par microscopie électronique à balayage (MEB) (**Figure 42**) et par microscopie optique classique (**Figure 43**).

L'observation des frottis sanguins à J12 et J21 en MEB montre la présence de nombreux globules rouges anormaux chez les souris gata-1-S310A/PPP (**Fig42**).

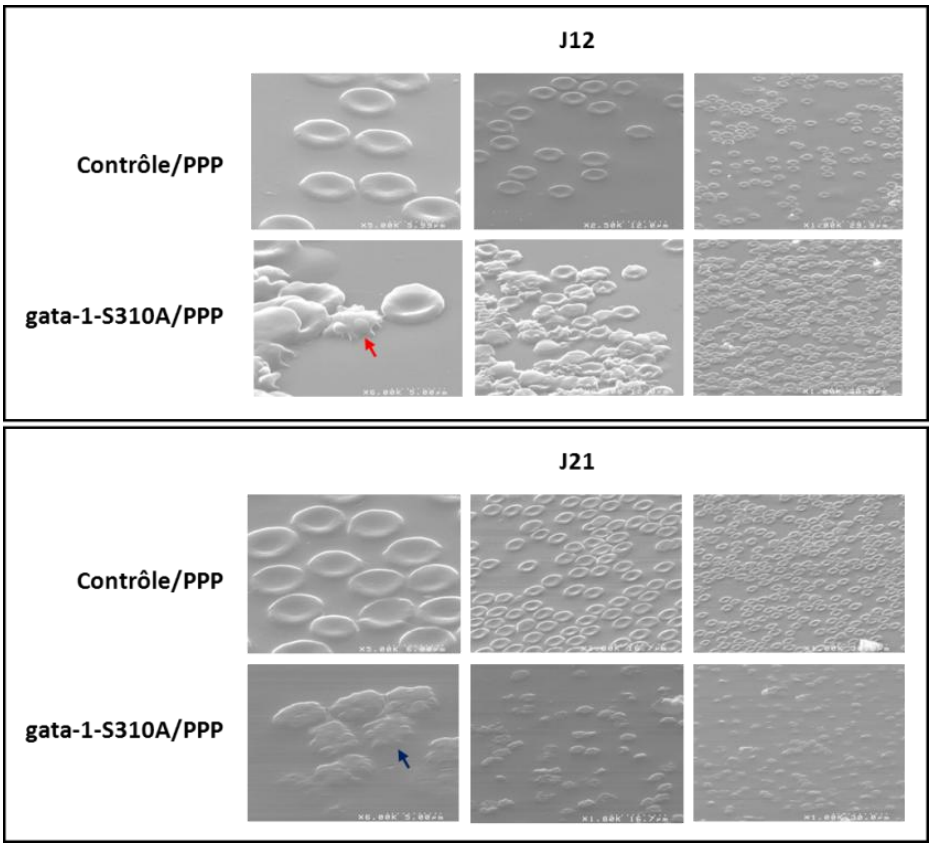


Figure 42 : Les globules rouges gata-1-S310A/PPP présentent une morphologie anormale en microscopie électronique à balayage.
Des frottis sanguins ont été réalisés pour les souris contrôle/PPP et gata-1-S310A/PPP à J12 et J21 et observés en microscopie optique à balayage (Plateforme de microscopie électronique – PSB/IBS/UVHCI – Grenoble). Les images présentées sont des clichés représentatifs pour chaque condition à différents grossissements (x6000, x2500 et x500). La flèche rouge indique un échinocyte : globule rouge dont la membrane est crénelée et hérissée. La flèche bleue indique un « fantôme » : un globule rouge lysé dont il ne reste que la membrane.

A J12, on observe déjà un changement de morphologie des globules rouges caractéristique d'une **échinocytose** : de nombreux globules rouges possèdent une membrane crénelée et hérissée (échinocytes – flèche rouge). A J21, la majorité des globules rouges gata-1-S310A/PPP sont très abîmés et ont perdu leur forme caractéristique de disque biconcave. On observe la présence de « fantômes », des **globules rouges lysés** dont il ne reste que la membrane (flèche bleue).

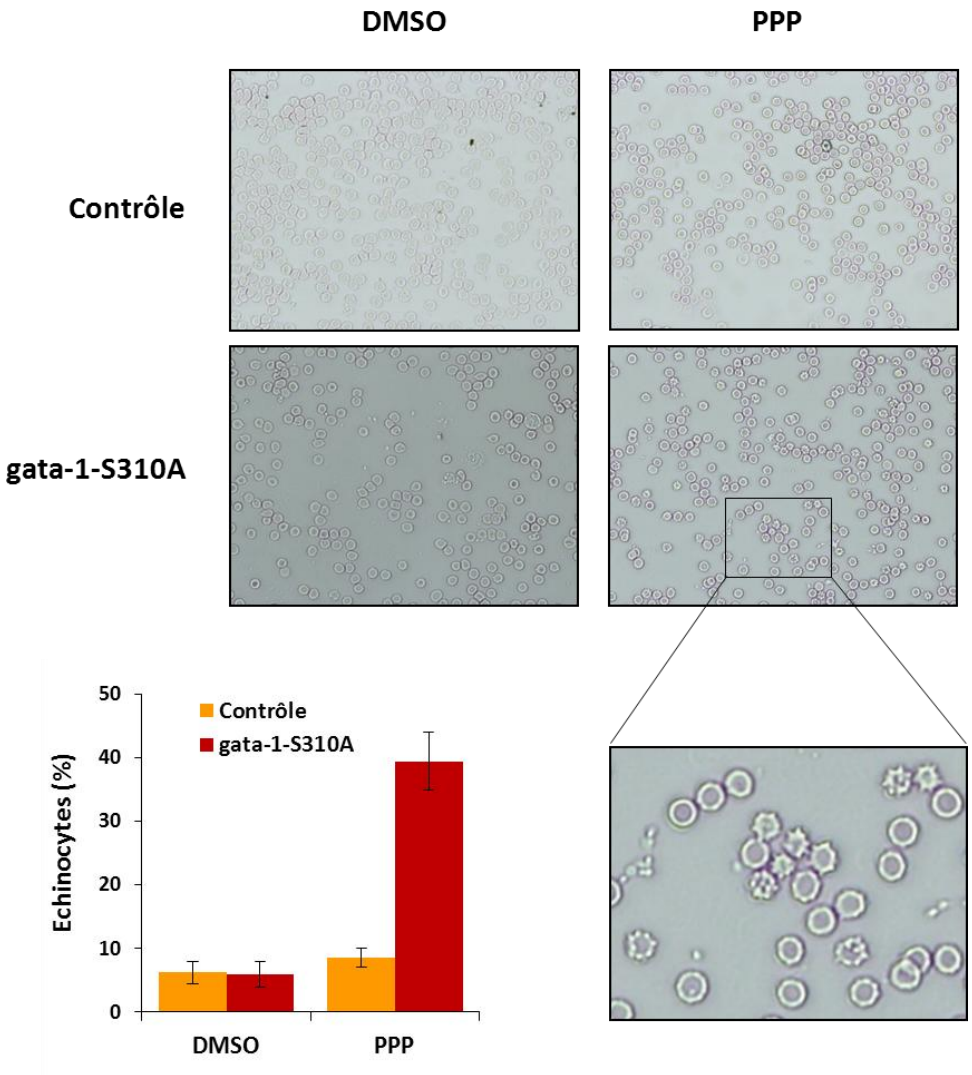


Figure 43 : <u>Les globules rouges gata-1-S310A/PPP présentent une morphologie anormale en microscopie optique.</u>
Les frottis sanguins des souris des quatre groupes réalisés à J12 ont été observés en microscopie optique. L'encart montre la présence d'échinocytes chez les souris gata-1-S310A/PPP. Le pourcentage d'échinocytes présents sur les frottis a été déterminé pour tous les individus de chaque groupe. Les moyennes obtenues sont représentées dans le graphique.

L'observation des frottis sanguins à J12 en microscopie optique (**Figure 43**) nous mène à la même conclusion : les globules rouges des individus gata-1-S310A/PPP présentent une morphologie anormale en échinocytes dès 12 jours (encart de la **Figure 43**). La visualisation en microscopie optique nous a permis d'évaluer le pourcentage d'échinocytes présents sur les frottis de chaque

condition (graphique de la **Figure 43**). Le traitement au DMSO ne semble pas produire d'échinocytes puisque les individus contrôle/DMSO et gata-1-S310A/DMSO présentent moins de 10% d'échinocytes. Ce pourcentage est inchangé lorsque les souris contrôles sont traitées par le PPP. En revanche, on dénombre en moyenne 40% d'échinocytes chez les individus gata-1-S310A/PPP.

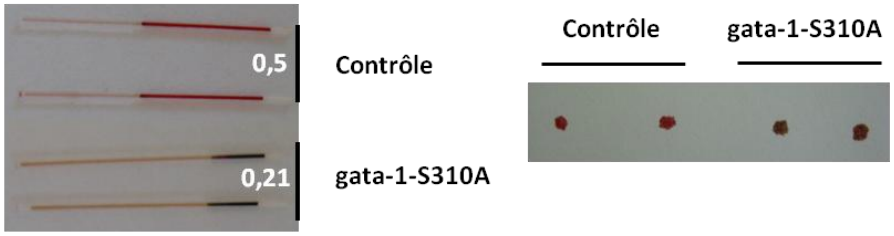
La présence d'échinocytes reflétant un défaut de la structure membranaire des globules rouges, nous pouvons en conclure que l'inhibition de la voie IGF-1 par le PPP entraîne chez les souris gata-1-S310A une fragilisation des érythrocytes dès J12, défaut fortement amplifié après 21 jours de traitement.

3.4. La teneur en hémoglobine des globules rouges des souris gata-1-S310A semble être modifiée après inhibition de la voie IGF-1 :

L'analyse des paramètres sanguins à J21 a montré que les individus de la cohorte gata-1-S310A/PPP présentent de nombreuses anomalies de la teneur en hémoglobine. Tout d'abord, l'hématocrite est fortement diminué. Toutefois, l'observation en microscopie nous a révélé que les globules rouges de ces individus à J21 étaient fortement abîmés. Nous avons donc réévalué l'hématocrite par une mesure sur capillaire des sangs des souris contrôle/PPP et gata-1-S310A/PPP (**Fig44A**). Après centrifugation des capillaires, nous avons calculé la moyenne des ratios volume de cellules/volume total pour chaque cohorte : les souris contrôle/PPP ont un ratio de 0,5 alors que celui des souris gata-1-S310A est de 0,21. Ce ratio est diminué de 50% par rapport aux souris contrôle/PPP : ces données sont donc comparables aux données obtenues précédemment par NFS (cf **Fig41**).

Lors du prélèvement sanguin, nous avions observé que le sang des souris gata-1-S310A/PPP présentait une coloration brune (**Fig44A**). La coloration brune du sang pourrait indiquer la présence de méthémoglobine dans les globules rouges. Nous avons donc évalué le taux de méthémoglobine présent dans les globules rouges des souris contrôles et gata-1-S310A traitées au PPP. Pour cela, nous avons récupéré les globules rouges puis, par choc hypotonique, nous avons récupéré l'hémoglobine que nous avons dosée par méthode spectrophotométrique (**Fig44B**). L'hémoglobine ayant un pic d'absorption à 420nm et la méthémoglobine à 630nm, le ratio des deux donne le pourcentage de méthémoglobine (Austin and Drabkin, 1935). Les souris gata-1-S310A/PPP présentent 8,6% de méthémoglobine, tandis que les contrôle/PPP ont un taux relativement bas de 1,6%. Il semblerait donc que les globules rouges des souris gata-1-S310A contiennent plus de méthémoglobine que les souris contrôles. Toutefois, ce taux reste tout de même raisonnable et n'explique pas à lui seul la couleur brune du sang des souris gata-1-S310A/PPP.

A.



B.

Longueur d'onde (nm)	Contrôle / PPP	gata-1-S310A / PPP
420 nm	1,740	0,463
630 nm	0,034	0,040
630/420	**1,9%**	**8,6%**

C.

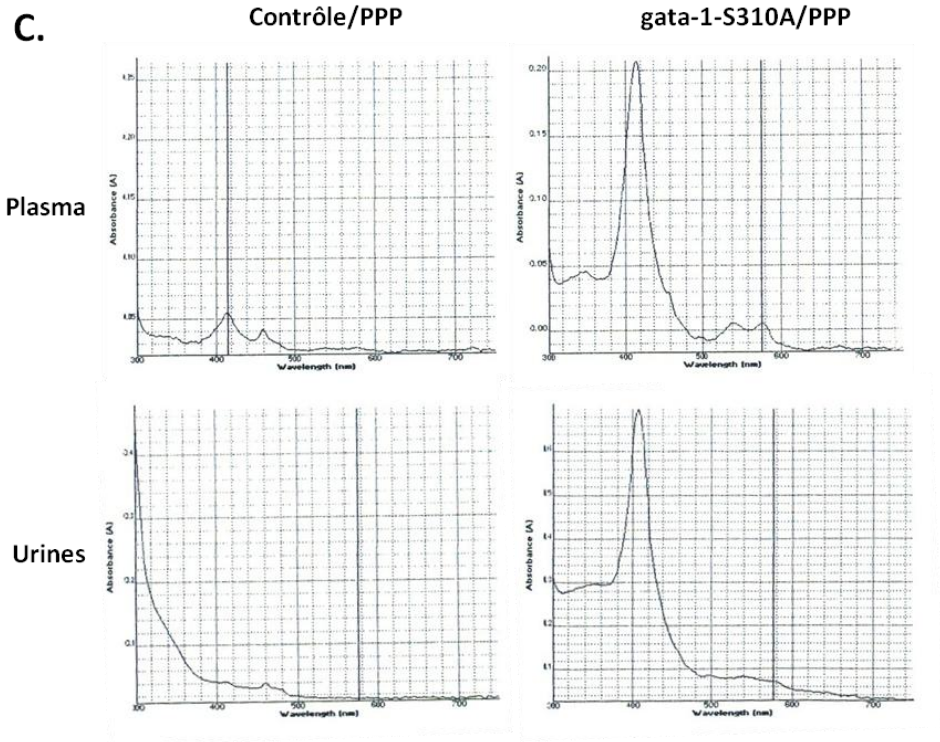


Figure 44 : <u>Les globules rouges des souris gata-1-S310A/PPP ont subi une hémolyse intravasculaire</u>
A. L'hématocrite des souris contrôle/PPP et gata-1-S310A/PPP a été évalué sur capillaire. Les ratios sont indiqués en blanc. La photo de droite montre la coloration brune du sang des souris gata-1-S310A/PPP par rapport au sang des souris contrôle/PPP. **B.** Les globules rouges des souris contrôle/PPP et gata-1-S310A/PPP ont été lysés par choc hypotonique et l'hémoglobine a été dosée par spectrophotométrie. L'hémoglobine a un pic d'absorption à 420nm, la méthémoglobine à 630nm. Le ratio des deux représente le taux de méthémoglobine. **C.** Le plasma et les urines des souris contrôle/PPP et gata-1-S310A/PPP ont été dosés par spectrophotométrie. La présence de méthémoglobine/méthémalbumine est détectée dans les deux fluides des souris gata-1-S310A/PPP.

D'où provient la couleur brune intense du sang des souris ?

Nous avons précédemment observé que les globules rouges des souris gata-1-S310A/PPP étaient très abîmés. Dans ce cas, il peut y avoir une hémolyse intra-vasculaire : les globules rouges lysés à l'intérieur des vaisseaux libèreraient leur contenu en hémoglobine dans le sérum. L'hémoglobine ainsi libérée se fixe à l'haptoglobine et ce complexe est phagocyté par les macrophages pour être recyclé. Lorsque l'hémolyse est trop importante, l'haptoglobine est saturée. L'hémoglobine restant libre est alors rapidement oxydée en méthémoglobine. La méthémoglobine se fixe alors à l'albumine plasmatique pour former la méthémalbumine. La méthémoglobine et/ou méthémalbumine donnent une coloration brune au plasma et aux urines. C'est ce que nous avons observé pour les souris gata-1-S310A/PPP. Nous avons donc mesuré le taux de méthémogobine/méthémalbumine dans le plasma et les urines par spectrophotométrie (**Fig44C**). On observe uniquement un faible signal d'absorbance dans le plasma et les urines des souris contrôle/PPP. Pour les souris gata-1-S310A/PPP, on observe dans les deux fluides un fort signal à 407nm accompagné d'un signal plus léger, mais distinct à 540 et 575nm. Ces bandes correspondent à la détection de la méthémogobine/méthémalbumine. **Ainsi, les globules rouges des souris gata-1-S310A/PPP ont subi une hémolyse intra-vasculaire massive avec libération de leur contenu en hémoglobine dans le sérum puis dans les urines.**

3.5. L'anémie des souris gata-1-S310A/PPP est-elle régénérative ou arégénérative ?

Le paragraphe précédent nous met sur la voie d'une anémie régénérative : l'apparition de méthémoglobine dans le plasma et dans les urines peut survenir suite à une hémolyse intra-vasculaire massive. Toutefois, nous ne pourrons conclure entièrement sur cette question que si, d'une part, la destruction des globules suit son chemin classique et que, d'autre part, les organes érythropoïétiques se sont mis en marche pour tenter de compenser la destruction des globules rouges.

3.5.1. Qu'en est-il des voies de dégradation des globules rouges ?

Lors de la dégradation de l'hémoglobine, le stockage du fer et l'élimination de la bilirubine sont effectués par le foie. Nous avons donc analysé le foie des souris gata-1-S310A/PPP et contrôle/PPP. Les pesées des organes indiquent que les moyennes des poids des foies des souris contrôle/PPP (1,37 $\pm$ 0,09 g) et gata-1-S310A/PPP (1,27 $\pm$ 0,20 g) sont équivalents. Par contre, l'aspect des foies est différent (**Figure 45**) : le foie des souris gata-1-S310A/PPP présentait déjà une coloration brune à l'autopsie, due certainement à l'excès de bilirubine.

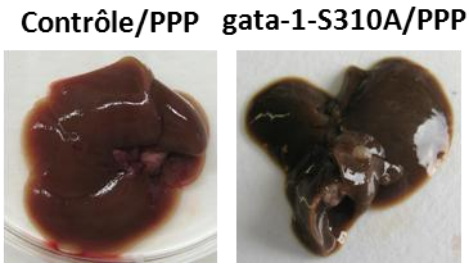


Figure 45 : <u>Le foie des souris gata-1-S310A/PPP présente une coloration brune</u>
Lors de l'autopsie, les foies des souris contrôle/PPP et gata-1-S310A/PPP ont été prélevés et photographiés. Le foie contrôle/PPP présente un aspect normal, tandis que le foie gata-1-S310A/PPP présente une coloration brune.

L'analyse histologique a été réalisée par deux types de coloration :

- la coloration en hématoxyline/éosine (HE) permettra d'apprécier la structure hépatique ;

- la coloration de Perls révèlera le contenu en produits de la dégradation de l'hémoglobine : les ions Fe^{3+} dérivés de l'hémoglobine réagissent avec le ferricyanure de potassium pour former un précipité bleu de ferricyanure ferrique.

Les images présentées correspondent à des clichés représentatifs parmi quatre séries et ont été obtenues pour une même souris contrôle/PPP et gata-1-S310A/PPP (**Figure 46**). Pour chaque souris, les résultats ont été confirmés sur quatre lobes hépatiques distincts analysés.

En coloration de Perls (grossissement x100), on observe dans les deux types de souris la structure classique des lobules hépatiques qui s'organisent autour de la veine centro-lobulaire. Les vaisseaux sont correctement positionnés en périphérie des lobules. En coloration HE et à plus gros grossissement (x400), on n'observe pas de lésions hépatiques ni de cellules de morphologies anormales (pas de diploïdie majeure des hépatocytes, ni d'hyperplasie) : **malgré une coloration brune du foie des souris gata-1-S310A, le traitement au PPP n'affecte pas la structure hépatique dans les deux types de souris.**

En coloration de Perls (grossissement x400), on n'observe aucun précipité bleuté dans le foie des souris contrôle/PPP. En revanche, le foie des souris gata-1-S310A/PPP présente une quantité importante de précipités bleus, indiquant la présence excessive de fer ferrique. Ayant observé une hémolyse intra-vasculaire massive chez ces souris, on peut penser que ces accumulations de fer ferreux correspondent à l'élimination de l'hémoglobine libérée dans le sang. On observe également dans le foie de ces souris de nombreuses cellules de Kupffer en périphérie de la veine centro-lobulaire (cercles bleus). Il s'agit de macrophages hépatiques de couleur bleutée contenant de nombreux globules rouges dont le contenu en hémoglobine a été dégradé. Ces macrophages procèdent à l'élimination par phagocytose de globules rouges malformés ou non fonctionnels : on parle alors d'érythrophagocytose. On peut noter que, dans le foie des souris gata-1-S310A/PPP, l'érythrophagocytose est massive. Nous pouvons tout de même noter que, malgré l'anémie sévère

constatée chez les souris gata-1-S310A/PPP, il n'y a pas de site d'érythropoïèse hépatique, caractérisée en coloration HE par des amas de nombreuses cellules de petite taille de coloration nucléaire très foncée sans cytoplasme.

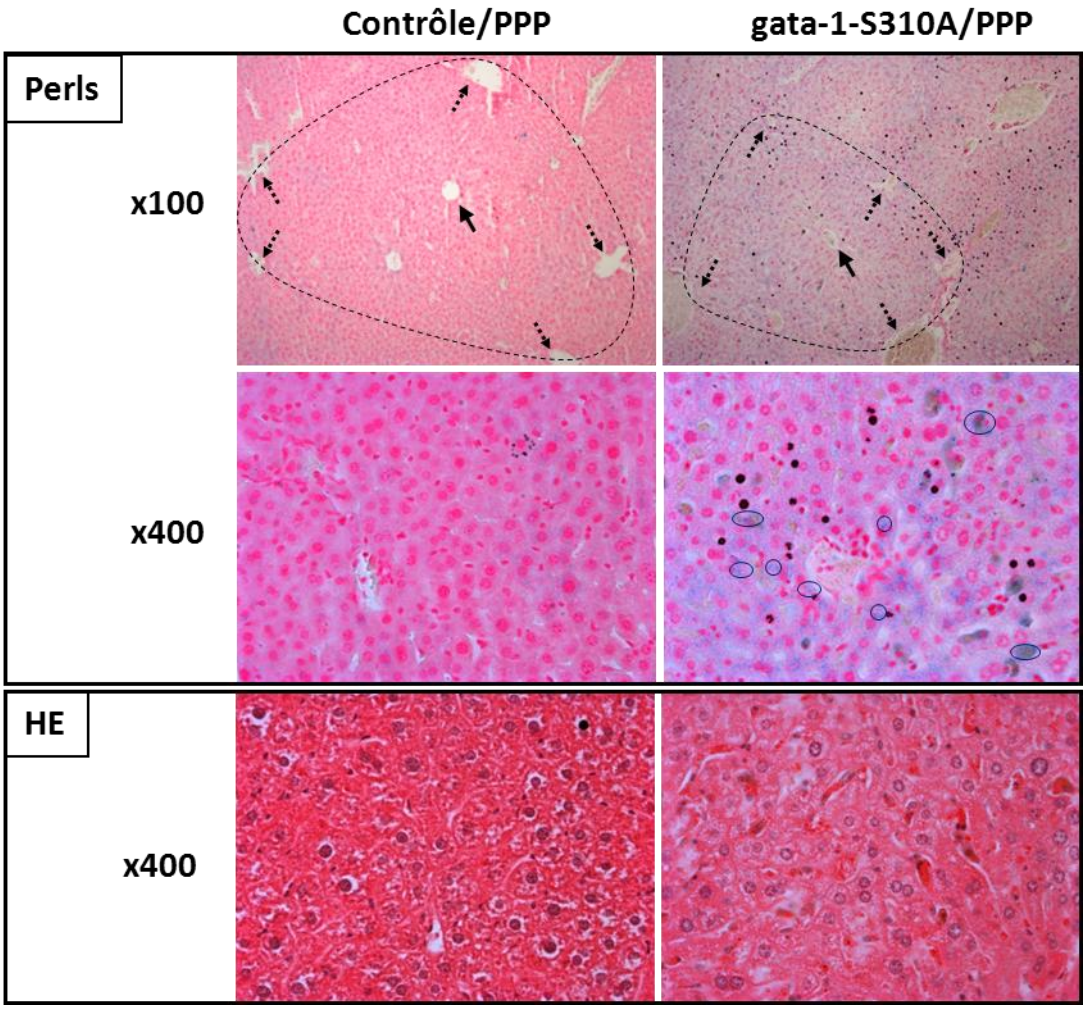


Figure 46 : <u>L'analyse histologique du foie révèle une érythrophagocytose hépatique chez les souris gata-1-S310A/PPP</u>
Des coupes de foie de souris contrôle/PPP et gata-1-S310A/PPP ont été réalisées puis colorées en Perls ou en Hématoxyline/Eosine (HE). La ligne en pointillés délimite un lobule hépatique. Les flèches pleines indiquent les veines centro-lobulaires. Les flèches en pointillés indiquent les vaisseaux. Les cercles bleus indiquent les cellules de Kupffer bleutées qui dégradent les globules rouges.

L'inhibition de la voie IGF-1 par le PPP entraîne donc chez les souris gata-1-S310A/PPP non seulement une malformation des globules rouges conduisant à une hémolyse intra-vasculaire massive, mais également une érythrophagocytose par voie hépatique.

3.5.2. Qu'en est-il des voies de production des globules rouges ?

3.5.2.a. Taux de réticulocytes circulants

Le premier reflet de la néo-production des globules rouges est le taux de réticulocytes circulants. Nous avons analysé à J21 le pourcentage de réticulocytes dans le sang par cytométrie en flux grâce à un marquage au Thiazole Orange pour les individus contrôle/PPP et gata-1-S310A/PPP. Afin d'analyser correctement les réticulocytes, nous avons également marqué les cellules avec l'anticorps Ter119.

On peut noter tout d'abord une nette différence dans la morphologie des globules rouges gata-1-S310A/PPP par rapport aux contrôle/PPP (**Figure 47**). En effet, l'analyse par les paramètres FSC (Forward Scatter) et SSC (Side Scatter), définissant respectivement la taille et la granulosité des cellules, montre une population de cellules gata-1-S310A/PPP très hétérogène, tandis que la population contrôle/PPP est homogène. Ce résultat est cohérent avec les images des frottis sanguins à J21. De plus, pour les canaux correspondant au signal d'émission du Thiazole Orange (530nm) et du Ter119 (APC-Cy7 : 767nm), les intensités moyennes de fluorescence (MFI) des deux échantillons non-marqués sont très différentes : pour les souris contrôle/PPP et gata-1-S310A/PPP, les MFI sont respectivement de 12 versus 1258 pour le Thiazole Orange et de 6 versus 283 pour le Ter-119. Il nous a donc été impossible d'analyser les deux types de cellules à l'aide des mêmes fenêtres. Nous avons donc défini des fenêtres d'analyse spécifiques pour chaque échantillon. De plus, étant donnée la différence de morphologie entre les cellules contrôle/PPP et gata-1-S310A/PPP, nous ne pouvions pas sélectionner par la morphologie la population à étudier pour déterminer le taux de réticulocytes. Ainsi, pour être sûr d'étudier des cellules érythroïdes matures, nous avons choisi de sélectionner la population positive pour le Ter119 et de mesurer dans cette population le pourcentage de cellules positives pour le Thiazole Orange (**Figure 48**).

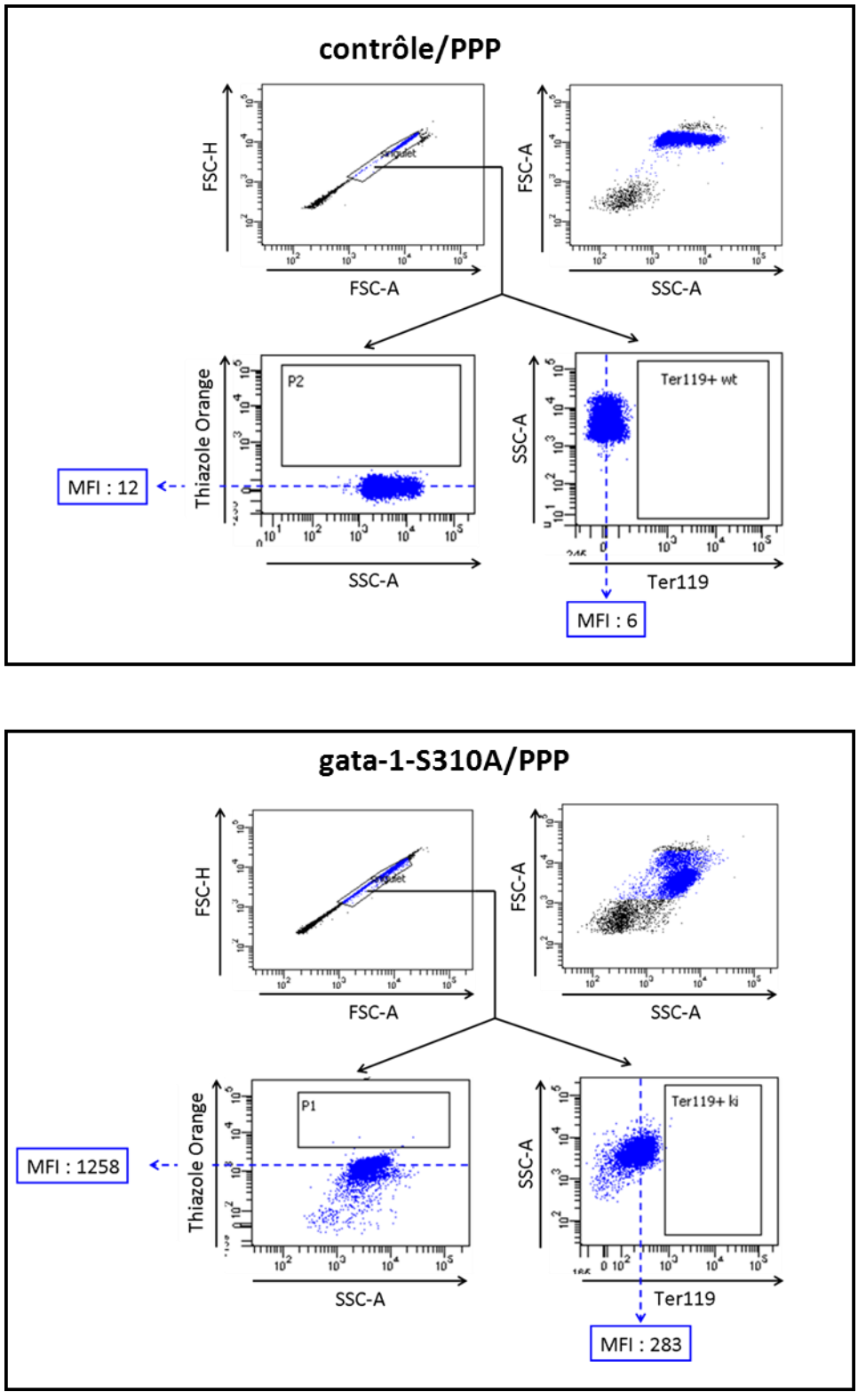


Figure 47 : <u>Méthode d'analyse du taux de réticulocytes circulants par cytométrie</u>
Le sang des souris contrôle/PPP et gata-1-S310A/PPP a été prélevé puis analysé en cytométrie. Les cellules contrôle/PPP et gata-1-S310A/PPP présentent une morphologie différente (graphe FSC-A/SSC-A). La sélection de la population à étudier par morphologie est donc impossible. En absence de marquage, les deux échantillons ont des intensités moyenne de fluorescence (MFI encadrées en bleu) très différentes pour les canaux correspondant au signal d'émission du Thiazole Orange (530nm) et du Ter119 (APC-Cy7 : 767nm). Les fenêtres d'analyse ont alors été définies spécifiquement pour chaque type de cellules.

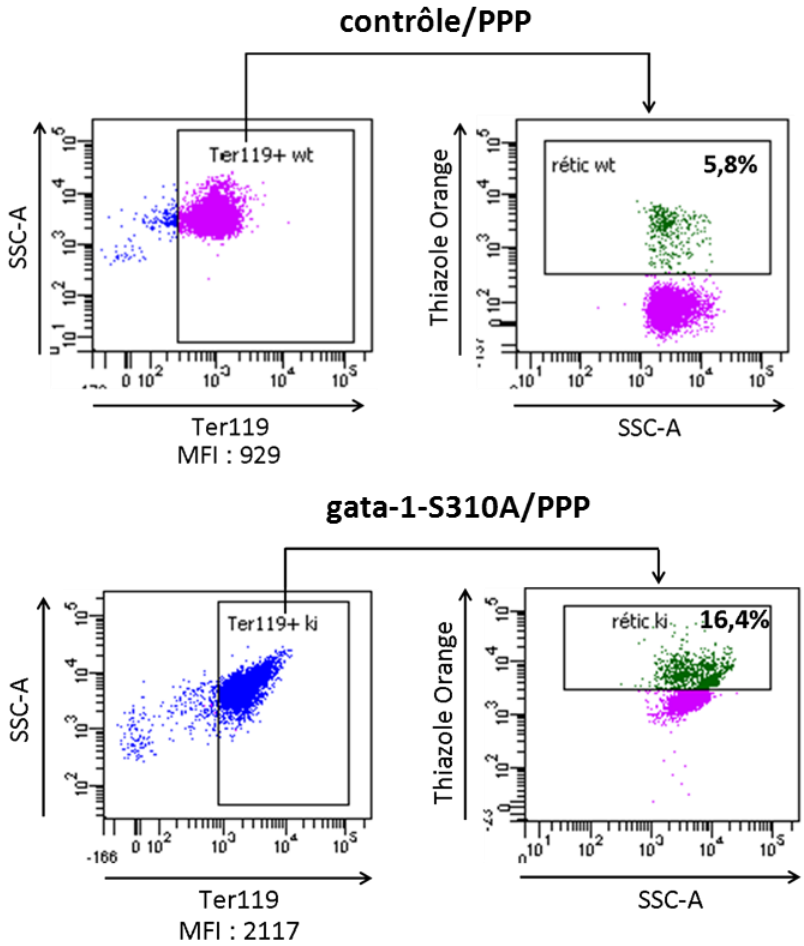


Figure 48 : <u>Les souris gata-1-S310A/PPP ont un taux de réticulocytes plus élevé</u>
Le sang des souris contrôle/PPP et gata-1-S310A/PPP a été prélevé, marqué au Thiazole Orange et au Ter119-APC-Cy7, puis analysé en cytométrie. Le pourcentage de réticulocytes (cellules positives au Thiazole Orange) a été déterminé parmi les cellules positives pour le Ter119.

Les résultats montrent que les souris contrôle/PPP présentent un taux de réticulocytes de 5,8%. Ce taux est légèrement supérieur au taux défini comme reflétant l'homéostasie des souris contrôle en début de cette étude (valeur aux alentours de 3-4%) : le traitement au PPP entraîne donc une augmentation de la production des réticulocytes chez les souris contrôle. Ce résultat est cohérent avec l'augmentation du taux de globules rouges observée dans les NFS des souris contrôle/PPP. Les souris gata-1-S310A/PPP présentent un taux de réticulocytes de 16,4% nettement supérieur à celui des souris contrôle/PPP et à celui des souris gata-1-S310A non traitées.

L'augmentation du taux de réticulocytes révèle une augmentation de la production érythrocytaire chez les souris gata-1-S310A/PPP. Ce résultat indique qu'il existe une néo-production élevée de globules rouges chez les souris gata-1-S310A/PPP, et va dans le sens d'une anémie régénérative.

3.5.2.b. Erythropoïèse médullaire

La moelle osseuse est le site principal de la production des globules rouges. Afin de rechercher les signes d'une néo-production médullaire chez les souris gata-1-S310A/PPP, nous avons analysé la moelle des souris contrôles et gata-1-S310A traitées par du DMSO ou du PPP. Pour cela, nous avons étudié d'une part les différentes populations de l'érythropoïèse terminale, et d'autre part les capacités clonogéniques des progéniteurs.

L'analyse des stades terminaux de l'érythropoïèse médullaire a été réalisée en cytométrie par les marqueurs CD71 et Ter119 (**Figure 49**).

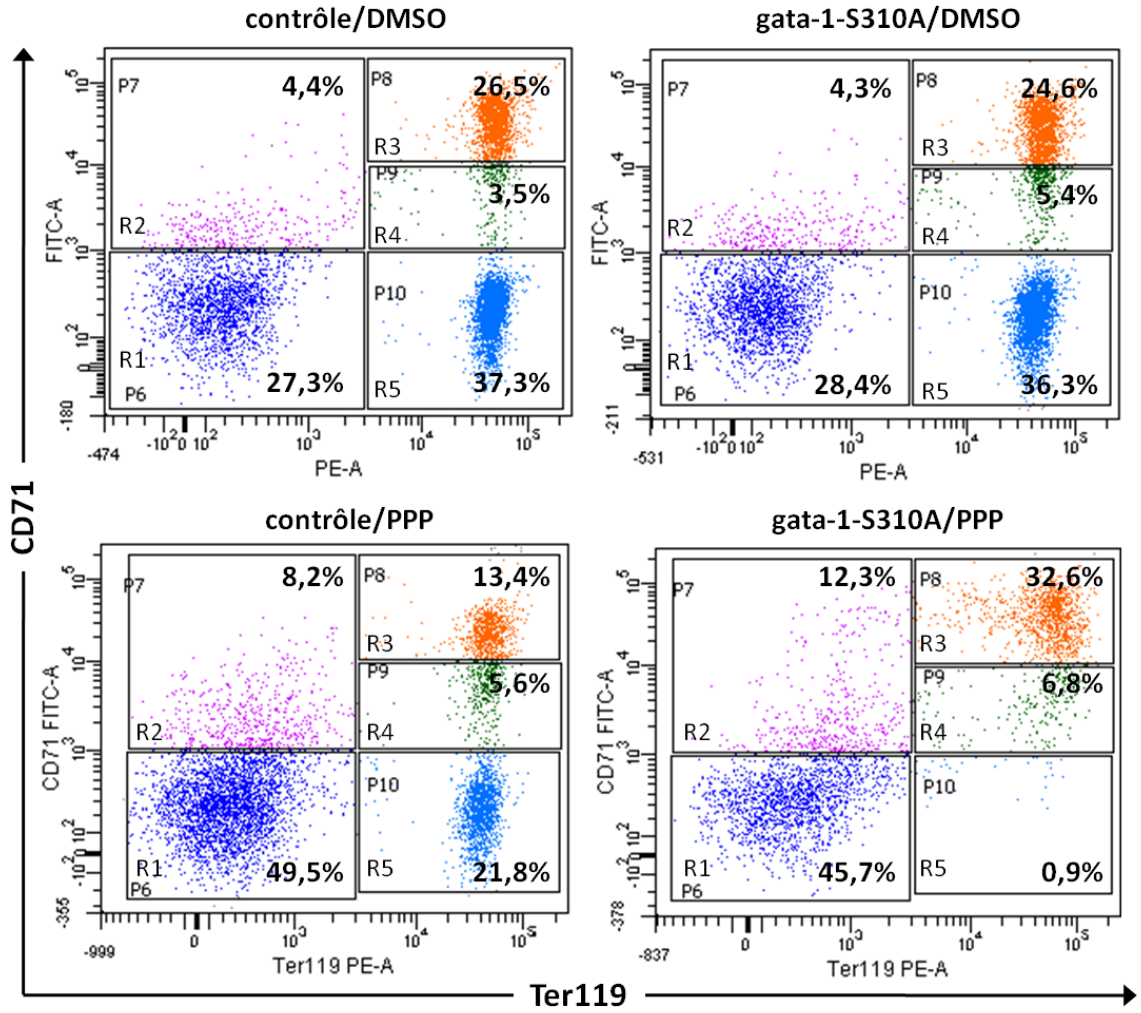


Figure 49 : <u>L'érythropoïèse médullaire des souris gata-1-S310A est activée par le traitement PPP</u>
Les cellules de moelle des quatre groupes de souris ont été analysées en cytométrie par les marqueurs CD71-FITC et Ter119-PE. Les pourcentages de chaque population sont indiqués. **R1** : progéniteurs précoces ; **R2** : proérythroblastes ; **R3** : érythroblastes basophiles ; **R4** : érythroblastes polychromatophiles et acidophiles ; **R5** : réticulocytes.

On remarque que le traitement PPP a un effet sur l'érythropoïèse médullaire des souris contrôle. En comparaison avec la cohorte DMSO, on observe, chez les souris contrôle/PPP, une augmentation de la population des progéniteurs (R1 : CD71-/Ter119-) (49,5% vs 27,3%), et de la population des

proérythroblastes (R2 : CD71+/Ter119-) (8,2% vs 4,4%). Si la population R4 est équivalente pour les cohortes DMSO et PPP, les valeurs obtenues pour R3 et R5 sont fortement diminuées par le traitement des souris contrôle au PPP. Ainsi, après traitement au PPP, les érythroblastes basophiles (R3 : $CD71^{high}$/Ter119+) passent de 26,5% à 13,4%, et la population la plus mature (R5 : CD71-/Ter119+) passe de 37,3% à 21,8%. Il semblerait donc que le traitement au PPP induit une augmentation de l'érythropoïèse médullaire, avec une augmentation du pool de progéniteurs précoces (R1) et une diminution parallèle des stades les plus matures (R3 et R5). Ce résultat est cohérent avec l'augmentation du nombre de globules rouges observé en NFS et l'augmentation du nombre de réticulocytes circulants.

Si l'on compare les valeurs obtenues pour les souris gata-1-S310A/PPP à celles des souris gata-1-S310A/DMSO, on observe, comme pour les cohortes contrôle, une augmentation de la population la plus immature (45,7% vs 28,4%). En ce qui concerne la population la plus mature (R5), on observe une disparition complète de cette population chez les souris traitées au PPP : elle ne représente plus que 0,9% des cellules, contre 36,3% après traitement au DMSO. Cette disparition peut s'expliquer par le passage rapide des stades les plus matures vers la circulation sanguine afin de répondre rapidement au stress induit par l'anémie sévère chez ces souris. Ces résultats sont cohérents avec les valeurs basses des constantes sanguines obtenues pour les souris gata-1-S310A/PPP. Un point étrange réside cependant dans le fait que la moelle osseuse de ces souris contient une proportion non négligeable d'érythroblastes basophiles. Cette population notée R3 ($CD71^{high}$/Ter119+) représente en effet 32,6% de la population totale, contre 24,6% en présence de DMSO. Ainsi, là où l'on s'attendrait à voir une diminution des stades les plus matures (comme chez les souris contrôle/PPP avec une diminution de 2 fois par rapport aux souris contrôle/DMSO), on observe chez les souris gata-1-S310A une accumulation de ces cellules dans la moelle.

Chez les souris contrôle, le traitement au PPP entraîne une augmentation de la production érythrocytaire médullaire en dehors d'un contexte d'anémie. Chez les souris gata-1-S310A/PPP, l'érythropoïèse médullaire est fortement activée : les progéniteurs précoces (R1) se différencient, augmentant ainsi le pool d'érythroblastes (R3), et les réticulocytes produits (R5) sont immédiatement mobilisés dans la circulation pour pallier à l'anémie sévère induite par le traitement.

Pour déterminer l'effet du traitement PPP sur les progéniteurs médullaires des souris contrôles et gata-1-S310A, nous avons réalisé une étude clonogénique (**Figure 50**).

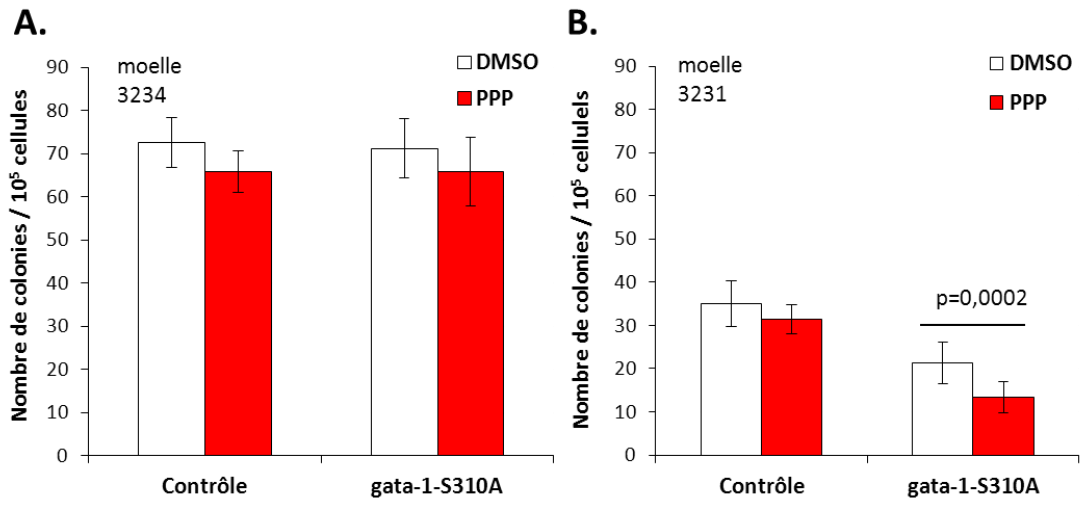


Figure 50 : <u>L'inhibition de la voie IGF-1 n'affecte pas la capacité clonogénique des progéniteurs gata-1-S310A en conditions optimales mais semble accroître leur dépendance à l'insuline et la transferrine</u>
A. 10^5 cellules de moelle de souris des quatre groupes ont été ensemencées dans un milieu semi-solide contenant de l'insuline et de la transferrine (M3234) supplémenté par 2U/mL d'Epo et 10ng/mL de SCF. A J14, le nombre de colonies BFU-e obtenu a été compté. Le graphique représente les moyennes de trois expériences. **B.** La même expérience a été réalisée dans un milieu sans insuline ni transferrine (M3231).

En conditions optimales de culture (milieu contenant de l'insuline et de l'holotransferrine – M3234), les progéniteurs des souris contrôle et gata-1-S310A traitées au PPP produisent le même nombre de colonies que les progéniteurs des souris non traitées (DMSO) (**Fig50A**). **En conditions optimales de culture, la capacité clonogénique des progéniteurs médullaires des souris gata-1-S310A n'est donc pas affectée par l'inhibition de la voie IGF-1.**

Dans un milieu ne contenant ni insuline ni transferrine (M3231), les progéniteurs contrôle/PPP produisent autant de colonies que les contrôle/DMSO (**Fig50B**). Par contre, le nombre de colonies formées par les progéniteurs gata-1-S310A/PPP est significativement inférieur à celui des gata-1-S310A/DMSO. **L'inhibition de la voie IGF-1 semble accroître la dépendance des progéniteurs gata-1-S310A à l'insuline et la transferrine**.

L'étude de la moelle révèle une activation de la production érythrocytaire médullaire chez les souris gata-1-S310A/PPP. De plus, la capacité clonogénique des progéniteurs gata-1-S310A/PPP n'est pas affectée en conditions optimales. Ces éléments vont également dans le sens d'une anémie régénérative.

3.5.2.c. Qu'en est-il de l'érythropoïèse de stress après traitement au PPP ?

Chez la souris, la rate est un organe érythropoïétique important. En conditions physiologiques, la production érythrocytaire splénique est limitée. En effet, la rate ne renferme que 10% de la totalité des progéniteurs érythroïdes. Cependant, lors d'un stress érythropoïétique, causé par une anémie

par exemple, la rate devient un organe érythroïde majeur. Les progéniteurs érythroïdes spléniques sont activés, permettant la mise en place d'une érythropoïèse de stress. Les souris gata-1-S310A/PPP présentaient une sévère anémie. S'il s'agit d'une anémie régénérative, nous devrions voir les signes d'une érythropoïèse de stress. Nous avons donc analysé la rate des individus contrôles et gata-1-S310A traités au PPP.

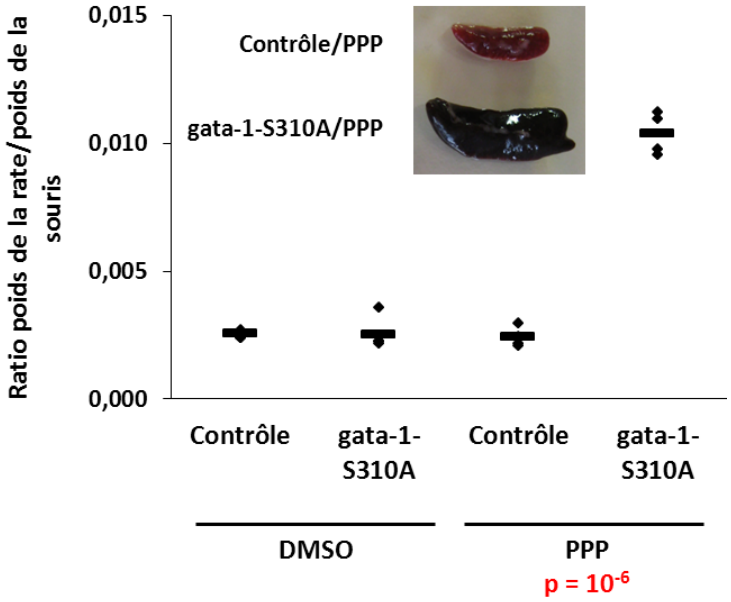


Figure 51 : <u>Les souris gata-1-S310A/PPP présentent une splénomégalie</u>
Les rates des souris de chaque cohorte ont été pesées et le poids a été rapporté au poids total de la souris. Les ratios obtenus sont représentés dans le graphique. Une photo représentative d'une rate contrôle/PPP et gata-1-S310A/PPP est présentée : la rate gata-1-S310A/PPP présente une coloration foncée, probablement due à une surcharge en fer.

Comme le montre la **Figure 51**, les souris gata-1-S310A/PPP présentaient une **splénomégalie**. Les rates ont été pesées et le poids de chaque rate a été rapporté au poids total de la souris. Le ratio est équivalent pour les souris contrôle/DMSO, gata-1-S310A/DMSO et contrôle/PPP. En revanche, il est significativement supérieur chez les souris gata-1-S310A/PPP. On peut noter que la rate des souris gata-1-S310A/PPP présentait, comme le foie de ces souris, une coloration foncée, certainement caractéristique d'une surcharge martiale.

Les rates ont été analysées en histologie par des colorations HE (Hématoxyline/Eosine) et Perls (**Figure 52**).

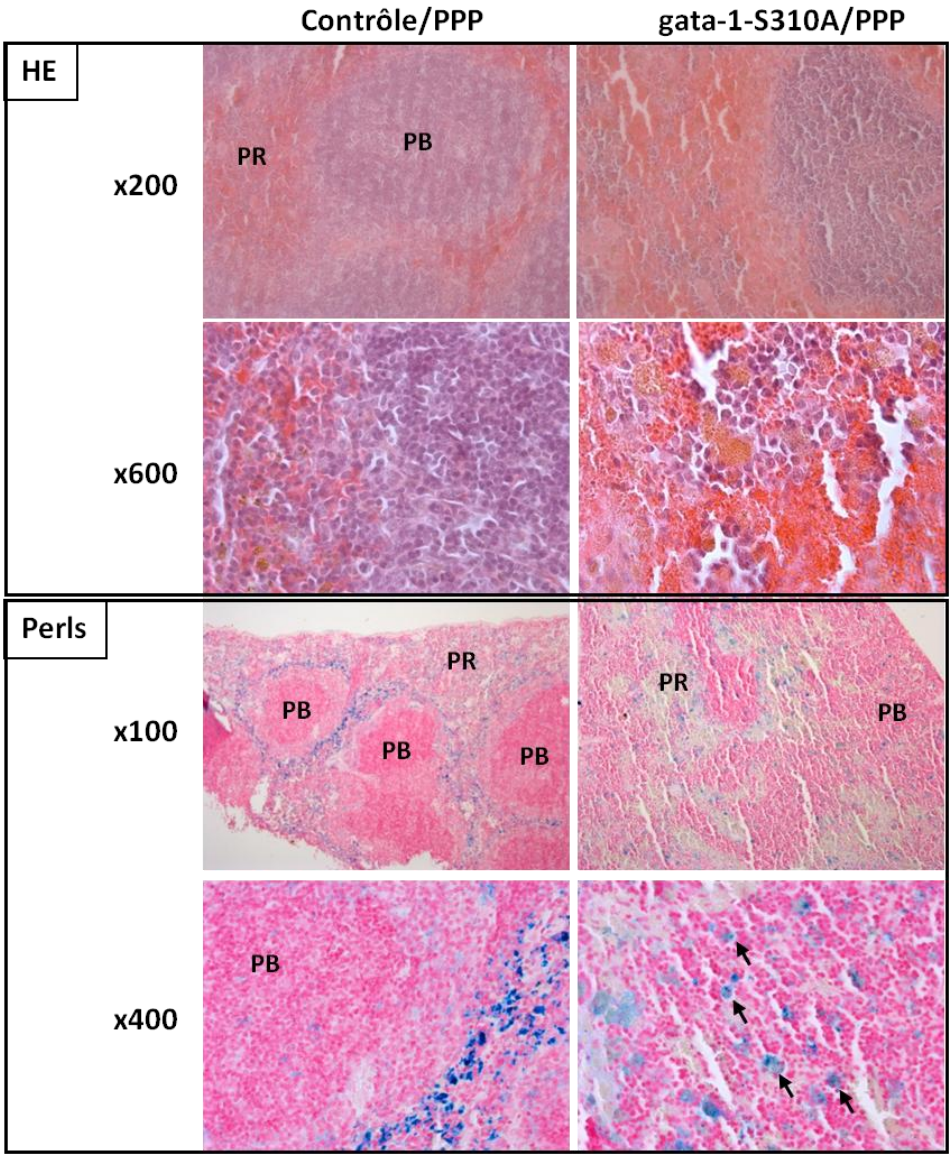


Figure 52 : <u>L'analyse histologique montre une désorganisation du tissu splénique chez les souris gata-1-S310A/PPP</u>
Des coupes de rate de souris contrôle/PPP et gata-1-S310A/PPP ont été réalisées puis colorées en Perls ou en Hématoxyline/Eosine (**HE**). Chez les souris contrôle/PPP, on distingue une structure organisée avec des follicules de pulpe blanche (**PB**) entourés de pulpe rouge (**PR**). La rate des souris gata-1-S310A/PPP présente une désorganisation de la structure tissulaire en faveur de la pulpe rouge. Les flèches indiquent la présence d'ions Fe^{3+} (précipités bleus en Perls).

La coloration HE permet d'analyser la structure de l'organe. Chez les souris contrôle/PPP, on observe une structure organisée classique de la rate dans laquelle on distingue d'une part la pulpe blanche (notée PB), et d'autre part la pulpe rouge (notée PR) contenant les sinusoïdes sanguins. Chez les souris gata-1-S310A/PPP, on remarque une désorganisation de la structure en faveur de la pulpe rouge (grossissement x600). **Cette structure est caractéristique d'une augmentation de la production de globules rouges par la rate**.

En coloration de Perls, on note également la désorganisation de la structure et l'absence de follicules de pulpe blanche (PB) chez les souris gata-1-S310A/PPP (x100). Chez les souris contrôle/PPP, on observe la présence de précipités bleus au sein de la pulpe rouge, indiquant la

présence d'ions Fe^{3+}. Ceci peut refléter une érythrophagocytose ou une néoproduction érythrocytaire. Chez les souris gata-1-S310A/PPP, on note également la présence d'ions Fe^{3+} (précipités bleus – flèches) disséminés dans l'ensemble du tissu splénique désorganisé. **Associée à la désorganisation de la structure, la présence d'ions Fe^{3+} peut refléter une augmentation de la production de globules rouges dans la rate de ces souris**.

La splénomégalie et l'analyse histologique de la rate suggèrent la présence d'une érythropoïèse de stress. Nous avons donc analysé :

- le contenu cellulaire de la rate par cytospin sur lame et coloration au MGG (May-Grünwald/Giemsa),
- les différentes populations érythroïdes par cytométrie,
- les progéniteurs érythroïdes par une analyse clonogénique.

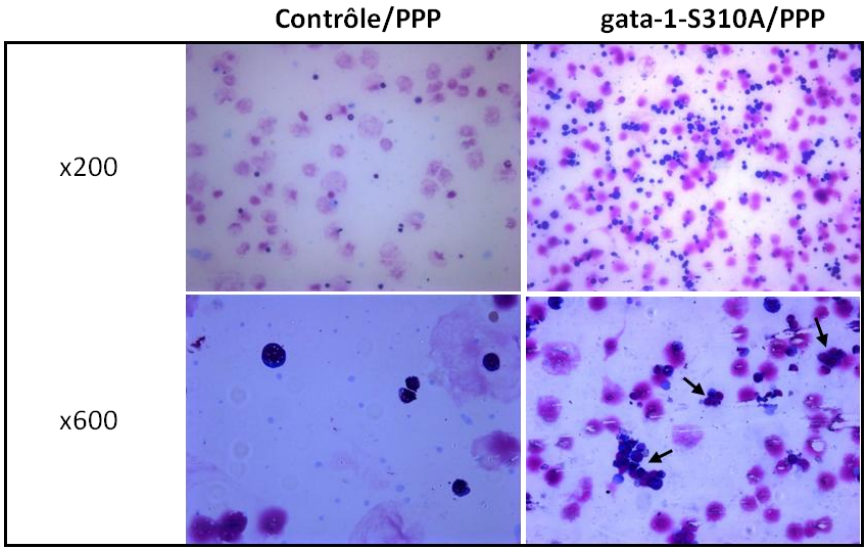


Figure 53 : <u>L'analyse du contenu cellulaire de la rate en MGG révèle une quantité importante de cellules érythroïdes chez les souris gata-1-S310A/PPP</u>
Les cellules de rate de souris contrôle/PPP et gata-1-S310A/PPP ont été déposées sur lame par cytospin puis colorées au May-Grünwald/Giemsa (MGG). Les flèches indiquent des cellules érythroïdes chez les souris gata-1-S310A/PPP.

La coloration au MGG montre une importante proportion de cellules érythroïdes dans la rate des souris gata-1-S310A/PPP (**flèches Figure 53**). Les cellules érythroïdes sont aisément reconnaissables par leur capacité à accumuler le colorant MGG dans leur noyau, leur donnant ainsi une coloration foncée caractéristique. On peut remarquer que la morphologie de ces cellules est hétérogène, allant de cellules de grande taille aux cellules à noyaux pycnotiques, caractéristiques de la maturation érythroïde. Ces cellules sont très peu présentes dans la rate des souris contrôle/PPP. **La production érythroïde semble donc être activée dans la rate des souris gata-1-S310A/PPP**.

Quelle est la composition de la population érythroïde splénique ? (**Figure 54**)

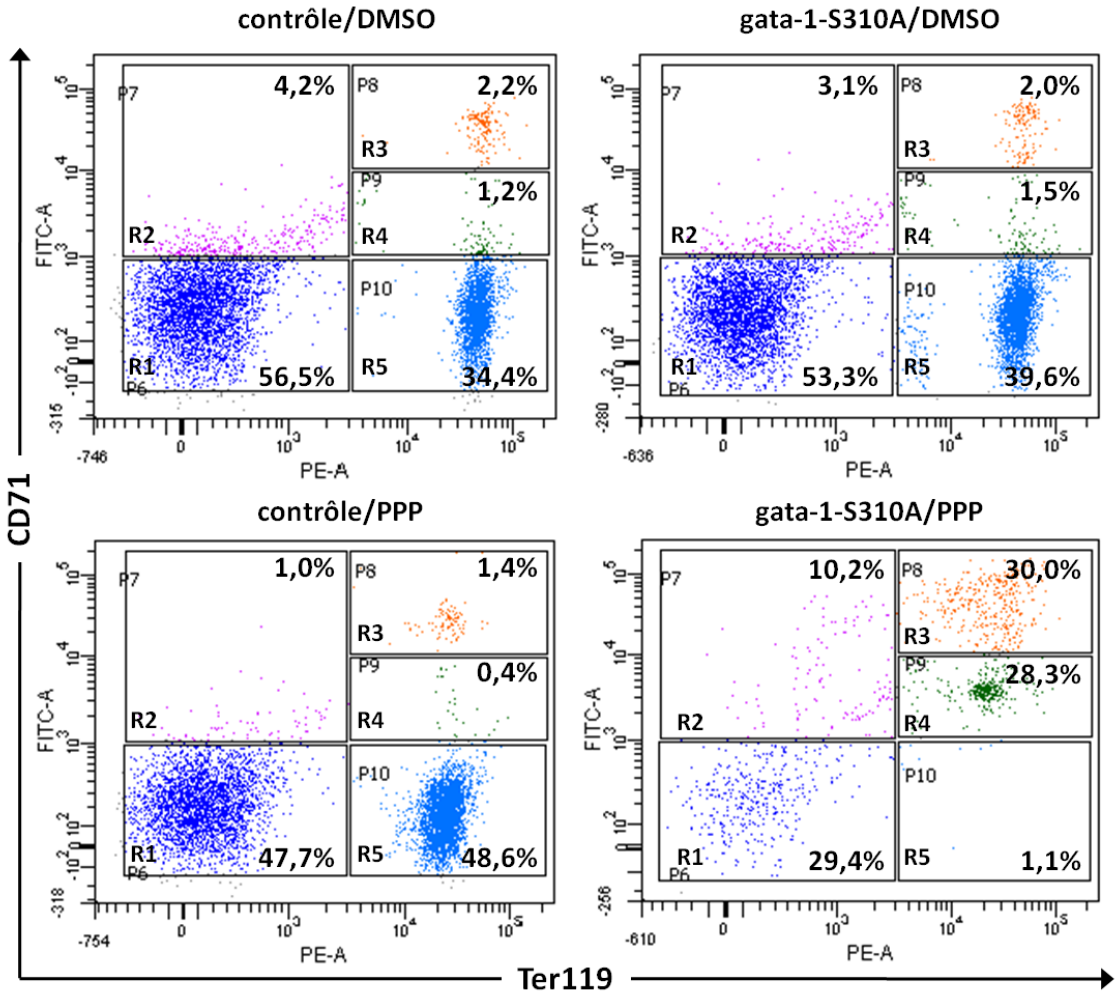


Figure 54 : L'érythropoïèse de stress est activée chez les souris gata-1-S310A/PPP
Les cellules de rate des quatre groupes de souris ont été analysées en cytométrie par les marqueurs CD71-FITC et Ter119-PE. Les pourcentages de chaque population sont indiqués. **R1** : progéniteurs précoces ; **R2** : proérythroblastes ; **R3** : érythroblastes basophiles ; **R4** : érythroblastes polychromatophiles et acidophiles ; **R5** : réticulocytes.

Nous pouvons tout d'abord remarquer que, chez les souris contrôle, le traitement au PPP entraîne une légère diminution des progéniteurs par rapport aux souris contrôle/DMSO (R1 : 47,7% versus 56,5%). Parallèlement, on observe une légère accumulation de la population la plus mature (R5 : 48,6% versus 34,4%). **Ainsi, comme dans la moelle, le traitement au PPP entraîne chez les souris contrôle une stimulation de la production érythroïde.** Toutefois, on peut noter que les stades les plus matures résident toujours dans la rate, et que cette production n'a pas entraîné de modification de la structure splénique comme l'a montré l'analyse histologique de la rate, ni de splénomégalie. **Il s'agit donc là d'une réponse érythroïde que l'on peut qualifier de mineure.**

L'analyse des cellules de la rate des souris gata-1-S310A/PPP révèle une forte diminution de la proportion des progéniteurs précoces chez les souris gata-1-S310A/PPP par rapport au souris gata-1-S310A/DMSO (R1 : 29,4% vs 53,3% respectivement). La population la plus mature est pratiquement

absente des rates des souris gata-1-S310A/PPP (R5 : 1,1% versus 39,6% pour les DMSO). Ces deux éléments traduisent une **activation de l'érythropoïèse splénique**. On peut également remarquer que, comme dans la moelle de ces souris, celle-ci est associée à une augmentation des populations intermédiaires correspondant aux érythroblastes basophiles (R3 : 30,0% versus 2,0%), et érythroblastes polychromatophiles et acidophiles (R4 : 28,3% versus 1,5%). **Ces éléments, observés chez les souris gata-1-S310A, sont caractéristiques de la mise en place d'une érythropoïèse de stress.**

La capacité des progéniteurs spléniques à former des colonies érythroïdes a été évaluée par une étude clonogénique (**Figure 55**).

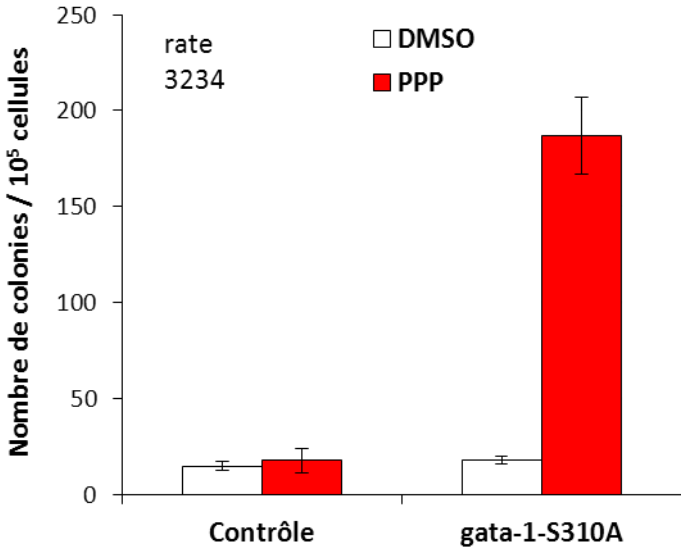


Figure 55 : <u>L'inhibition de la voie IGF-1 augmente de 10 fois la capacité clonogénique des progéniteurs spléniques gata-1-S310A</u>
10^5 cellules de rate de souris des quatre groupes ont été ensemencées dans un milieu semi-solide contenant de l'insuline et de la transferrine (M3234) supplémenté par 2U/mL d'Epo et 10ng/mL de SCF. A J14, le nombre de colonies BFU-e obtenu a été compté. Le graphique représente les moyennes de trois expériences.

Le nombre de colonies formées par les progéniteurs contrôle/DMSO, gata-1-S310A/DMSO et contrôle/PPP est équivalent. En revanche, les progéniteurs gata-1-S310A/PPP produisent 10 fois plus de colonies que les trois autres groupes. La rate des souris gata-1-S310A/PPP contient 10 fois plus de progéniteurs capables de se différencier que la rate des souris des groupes contrôles. **La rate des souris gata-1-S310A/PPP contient une grande quantité de progéniteurs de stress activés**.

En conclusion, l'analyse de la rate a révélé la mise en place d'une érythropoïèse de stress chez les souris gata-1-S310A/PPP pour pallier à l'anémie sévère induite par l'inhibition de la voie IGF-1. Chez les souris contrôle, le traitement au PPP induit également une stimulation de l'érythropoïèse

splénique mineure avec accumulation des stades les plus matures *in situ* et sans modification de la structure de la rate.

L'ensemble de ces résultats indique que les voies de production des globules rouges sont activées en réponse à l'inhibition de la voie IGF-1 chez les souris gata-1-S310A. En effet, le taux de réticulocytes circulants est augmenté, la production médullaire est accélérée, et les progéniteurs érythroïdes de stress contenus dans la rate sont activés pour mettre en place l'érythropoïèse de stress.

Nous pouvons alors conclure que l'anémie hémolytique induite par l'inhibition de la voie IGF-1 chez les souris gata-1-S310A est une anémie régénérative.

4. Compléments de l'étude de l'érythropoïèse des souris gata-1-S310A : résultats préliminaires

L'ensemble de nos résultats montre que la voie IGF-1 joue un rôle essentiel dans l'érythropoïèse des souris gata-1-S310A. L'inhibition de la voie IGF-1 entraîne l'apparition de défauts morphologiques de la membrane des globules rouges gata-1-S310A. Ces anomalies morphologiques sont certainement à l'origine de l'érythrophagocytose hépatique observée chez les souris gata-1-S310A/PPP et de l'hémolyse intra-vasculaire ayant entraîné l'anémie sévère. Pour tenter de pallier à cette anémie, l'érythropoïèse médullaire est accélérée et une érythropoïèse de stress splénique se met en place.

L'inhibition de la voie IGF-1 par le PPP nous a permis de révéler que l'absence de phosphorylation de GATA-1 entraîne des défauts morphologiques des érythrocytes. Toutefois, en absence de tout traitement, nous avons noté que la durée de vie des globules rouges était réduite. Dans des conditions physiologiques normales, ces défauts semblent être compensés par la suractivation de la voie IGF-1, puisque les souris gata-1-S310A présentent des paramètres sanguins normaux. S'il existe une compensation, quels en sont les mécanismes ? Dans ce paragraphe, j'ai tenté d'étudier par différentes approches les mécanismes mis en place dans cette compensation. J'ai délibérément qualifié ces résultats de préliminaires car ils sont issus d'un échantillon réduit d'expériences et à l'heure actuelle, ces expériences sont encore en cours au laboratoire. J'ai tout de même tenu à les faire figurer dans ce manuscrit car ils permettront d'enrichir la discussion relative à ce chapitre.

4.1. Pourquoi les globules rouges des souris gata-1-S310A ont-ils une durée de vie inférieure à celle des souris contrôle ?

Par marquage des globules rouges *in vivo*, nous avons montré qu'en condition d'homéostasie, les globules rouges des souris gata-1-S310A présentent une durée de vie diminuée de moitié par rapport aux souris contrôle. De plus, l'inhibition de la voie IGF-1 par le PPP entraîne chez les souris gata-1-S310A des anomalies de la structure membranaire des globules rouges avec apparition, dès 12 jours de traitement, de nombreux échinocytes. Quel peut être le lien entre ces deux observations ?

La signalisation IGF-1 a été impliquée dans le transport du glucose et le recrutement des transporteurs GLUT à la membrane (Dimitriadis et al., 2008). La voie PI3K/Akt a été décrite comme centrale dans ce processus (Olianas et al., 2011). Il a été également décrit chez l'homme qu'une mutation du transporteur du glucose GLUT-1 entraîne l'apparition d'échinocytes (Weber et al., 2008). Existe-t-il un défaut de l'incorporation du glucose chez les souris gata-1-S310A ?

Pour répondre à cette question, nous avons mesuré l'incorporation du glucose par les globules rouges des souris gata-1-S310A et contrôles. Après élimination du sérum par trois lavages successifs, les globules rouges (2.10^5 ou 5.10^5 cellules / essai) sont cultivés dans un milieu RPMI sans glucose en présence d'un analogue du glucose couplé à un fluorochrome (2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose ou 2-NBD-glucose : 150 µg/mL). L'apigénine, un inhibiteur de l'incorporation du glucose (Park, 1999), a été utilisée comme contrôle négatif et est ajoutée (apigénine : 100 µM) ou non (-) au milieu de culture. Après 30 minutes d'incubation et lavages, la fluorescence mesurée dans les cellules reflète l'incorporation du 2-NBD-glucose. Les résultats sont présentés **Figure 56**.

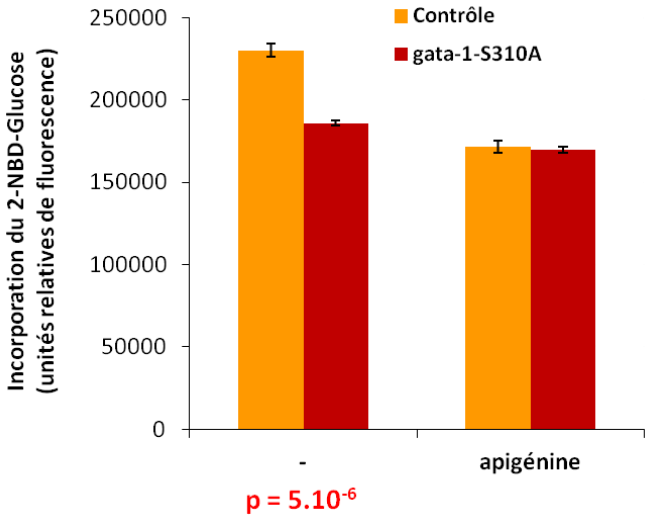


Figure 56 : <u>L'incorporation du glucose par les globules rouges gata-1-S310A est inférieure à celle des contrôles</u>
2.10^5 ou 5.10^5 globules rouges de souris contrôle et gata-1-S310A sont mis en culture dans 100µL de milieu RPMI sans glucose. L'apigénine (100µM) est ajoutée ou non (-) au milieu de culture. Puis 150µg/mL de 2-NBD-Glucose (analogue fluorescent du glucose) sont ajoutés au milieu. Les cellules sont incubées 30min à 37°C. La fluorescence obtenue est mesurée par un lecteur de plaque (excitation : 485nm ; émission : 535nm).

En présence d'apigénine, la fluorescence des globules rouges contrôles et gata-1-S310A est similaire : cette valeur définit le taux basal de fluorescence non imputable au transport actif du glucose par ses récepteurs spécifiques. Par contre, en absence d'inhibiteur, on observe une différence de fluorescence significative entre les cellules contrôles et gata-1-S310A : **l'incorporation du glucose des globules rouges des souris gata-1-S310A est inférieure à celle des globules rouges des souris contrôles.**

Quelle peut être l'origine de cette diminution significative d'incorporation du glucose ? La piste que nous avons suivie concerne le récepteur en lui-même. Chez la souris adulte, seul le récepteur GLUT-4 est exprimé à la surface des globules rouges (Montel-Hagen et al., 2008). Nous avons donc analysé la présence du transporteur GLUT-4 dans les érythrocytes contrôles et gata-1-S310A (**Figure 57**).

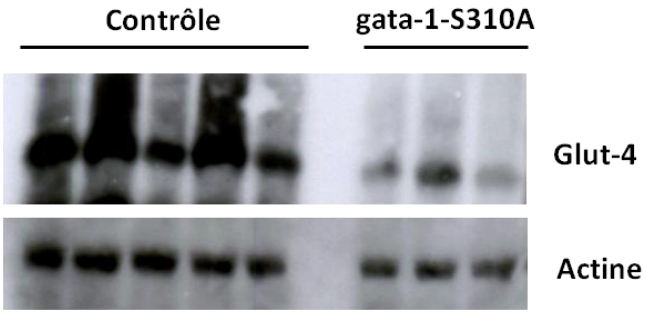


Figure 57 : L'expression du transporteur de glucose GLUT-4 est diminuée dans les érythrocytes gata-1-S310A
Les globules rouges contrôles et gata-1-S310A sont soumis à un choc hypotonique. Les membranes sont alors récupérées par centrifugation et la présence du transporteur GLUT-4 est analysée en Western Blot. Le signal Actine est utilisé comme contrôle.

Pour cela, 10^6 globules rouges sont soumis à un choc hypotonique. Les membranes sont ensuite récupérées par centrifugation et analysées par Western Blot. Le signal actine est utilisé comme contrôle et montre une quantité équivalente de protéines dans chaque échantillon. Les signaux obtenus montrent une forte diminution de la quantité de protéines GLUT-4 dans les érythrocytes gata-1-S310A par rapport aux contrôles. **Nous pouvons alors supposer que, chez les souris gata-1-S310A, la quantité de transporteurs GLUT-4 à la membrane est diminuée. Cette diminution est certainement à l'origine du défaut de l'incorporation du glucose chez ces souris.**

Le récepteur GLUT-4 est-il le seul élément déficient de la membrane des globules rouges des souris gata-1-S310A ? Qu'en est-il des autres protéines de la membrane ? Nous avons analysé le contenu en protéines de la membrane des globules rouges contrôles et gata-1-S310A (**Figure 58**).

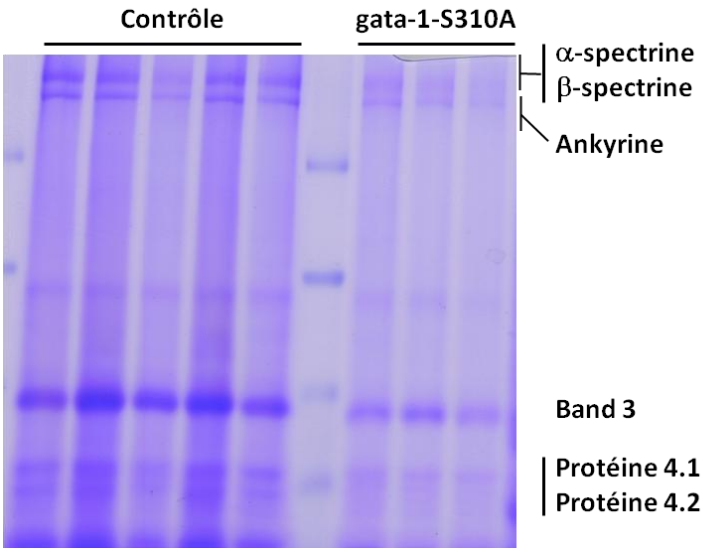


Figure 58 : <u>Les membranes des érythrocytes gata-1-S310A contiennent moins de protéines que les contrôles</u>
Les membranes des globules rouges sont lysées puis déposées sur gel SDS-PAGE. Le gel est coloré au bleu de Coomassie. Les différentes protéines visualisées (indiquées à droite) sont identifiées en fonction de leur poids moléculaire grâce au marqueur de poids (piste centrale).

Pour cela, les membranes des globules rouges ont été lysées et déposées sur gel SDS-PAGE. Les protéines membranaires sont ensuite visualisées par une coloration au bleu de Coomassie. Les différentes protéines sont identifiées en fonction de leur poids moléculaire. Pour chaque protéine identifiée (α-spectrine, β-spectrine, Ankyrine, Band3, protéine 4.1R et protéine 4.2), la quantité de protéines présente dans les échantillons gata-1-S310A semble inférieure au contrôle. **En plus de la diminution du récepteur GLUT-4, les globules rouges gata-1-S310A présentent une diminution globale des protéines de membrane. Cette diminution pourrait expliquer la durée de vie diminuée des globules rouges des souris gata-1-S310A. Ainsi, la phosphorylation de GATA-1 par Akt semble être impliquée dans la régulation des protéines membranaires à la surface des globules rouges.**

4.2. <u>Pistes d'explications moléculaires de la compensation de l'absence de phosphorylation de GATA-1 chez les souris gata-1-S310A</u>

Dans le chapitre précédent, nous avons montré qu'une modification des quantités relatives de protéines GATA-1 et FOG-1 pouvait compenser l'absence de phosphorylation de GATA-1, favorisant la formation de complexes GATA-1-S310A/FOG-1 et restaurer une différenciation érythroïde complète *in vitro*. Existe-t-il un tel mécanisme *in vivo* ? Nous avons posé l'hypothèse qu'un des mécanismes de compensation mis en place *in vivo* pouvait impliquer les quantités relatives de protéines exprimées. Le foie fœtal étant composé majoritairement de cellules érythroïdes, nous avons analysé les quantités relatives des protéines GATA-1 et FOG-1 exprimées au cours de

l'érythropoïèse fœtale dans les foies d'embryons gata-1-S310A et contrôles de 11.5 jours (E11.5) (**Figure 59**).

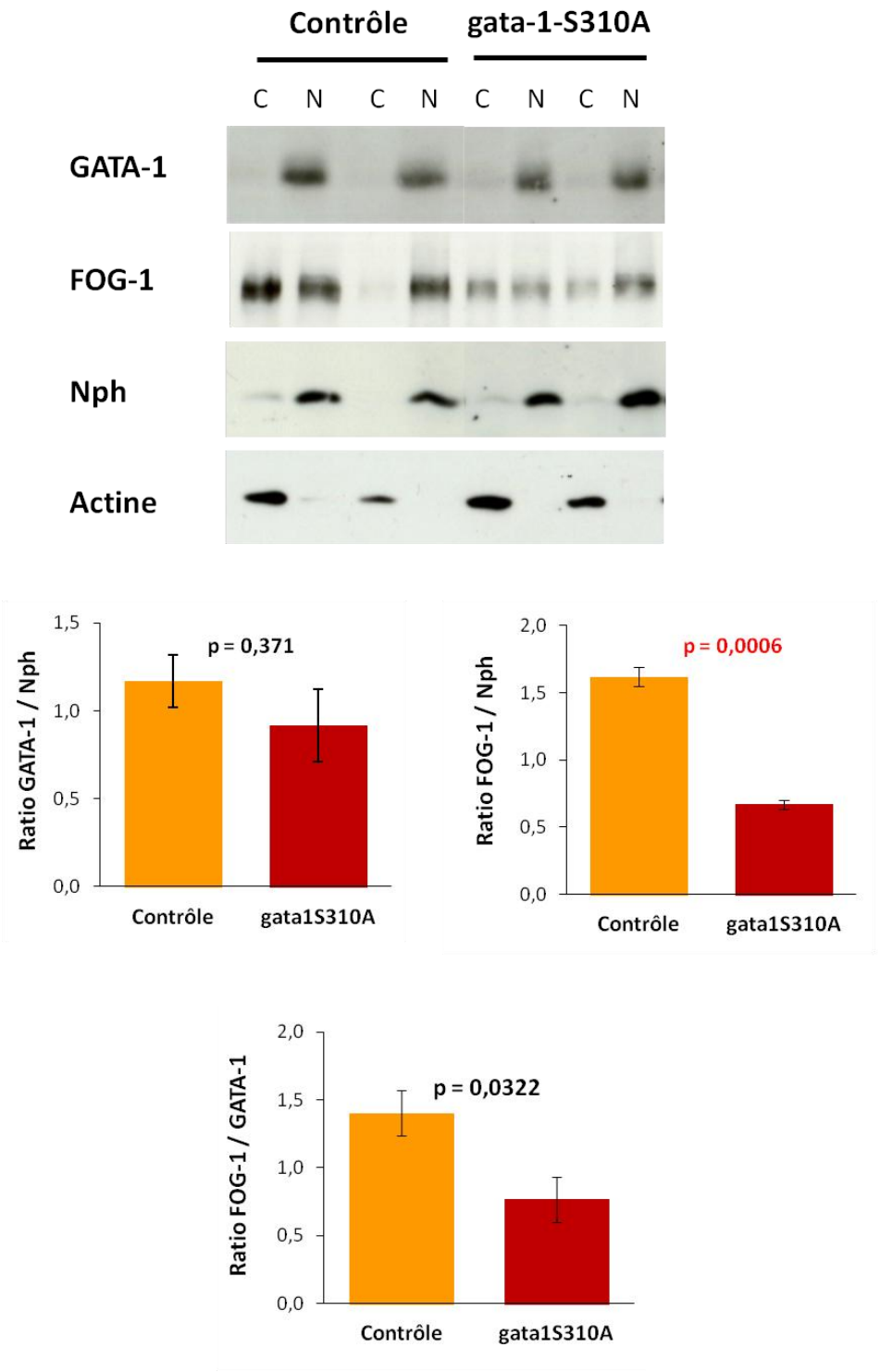


Figure 59 : <u>Les quantités relatives de protéines GATA-1 et FOG-1 sont modifiées dans les foies fœtaux gata-1-S310A</u>
Les cellules de foie fœtal d'embryons de 11,5 jours (E11.5) sont lysées puis les fractions cytoplasmiques (**C**) et nucléaires (**N**) sont analysées par Western Blot. La nucléophosmine (**Nph**), protéine nucléaire, et l'actine, protéine cytoplasmique, sont utilisées comme contrôle. Pour chaque échantillon, les quantités de protéines nucléaires GATA-1 et FOG-1 sont mesurées puis rapportées chacune à la quantité de Nph. Les moyennes sont représentées dans les deux premiers graphiques. Le ratio FOG-1/GATA-1 est ensuite calculé et représenté dans le dernier graphique. Les probabilités p sont calculées par un test de Student.

Les résultats montrent que la quantité de GATA-1 est équivalente dans tous les échantillons. En effet, le ratio GATA-1/Nph n'est pas significativement différent d'un génotype à l'autre. A l'inverse, la quantité de protéines FOG-1 semble être plus faible dans les embryons gata-1-S310A. En effet, le ratio FOG-1/Nph est significativement inférieur dans les embryons gata-1-S310A par rapport au contrôle. Comme le montre le ratio FOG-1/GATA-1, les quantités relatives de protéines GATA-1 et FOG-1 sont différentes selon le génotype des embryons. **Les cellules érythroïdes des embryons gata-1-S310A contiennent donc une quantité relative de protéines FOG-1 par rapport à GATA-1 inférieure à celle des cellules contrôles.**

Contrairement à ce que l'on aurait pu attendre, on observe une diminution de la quantité de protéines FOG-1 tandis que la quantité de GATA-1-S310A reste constante. Dans ce cas, la quantité de complexes GATA-1-S310A/FOG-1 formés n'a pas de raison d'augmenter. Par contre, si elle reste constante, la diminution de la quantité totale de FOG-1 conduirait à une diminution de la quantité de protéines FOG-1 libres, non liées à GATA-1. Un excès de protéines FOG-1 libres est peut-être délétère pour la cellule. Cependant, ces résultats nécessitent d'être confirmés avant de pouvoir en tirer une conclusion.

Nous avons analysé l'expression de différents gènes par PCR-quantitative au cours de l'érythropoïèse fœtale dans des embryons de 11,5 jours.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression des acteurs moléculaires impliqués dans notre modèle : GATA-1, FOG-1, Akt et pRb (**Figure 60**).

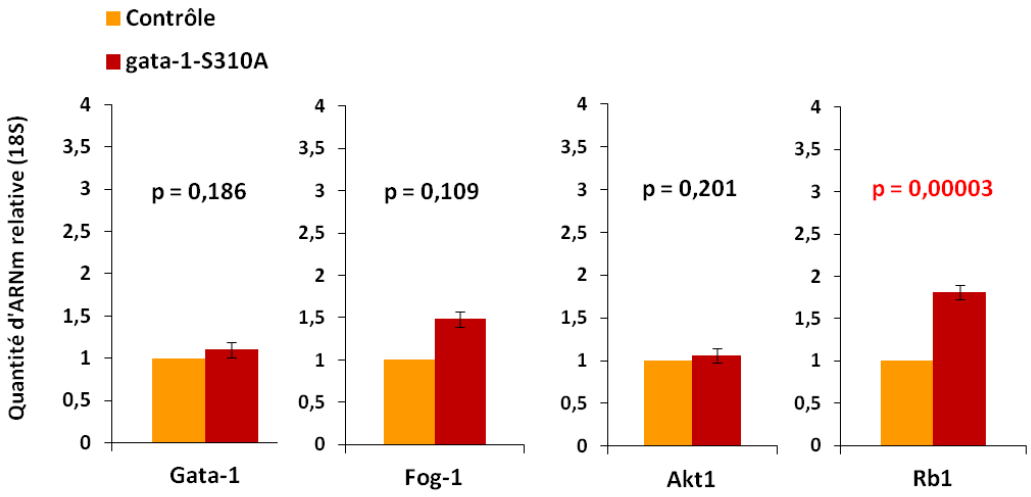


Figure 60 : <u>L'expression de Rb1 semble être augmentée dans les foies fœtaux gata-1-S310A</u>
L'ARN des cellules de foies fœtaux contrôle et gata-1-S310A est extrait et l'expression de Gata-1, Fog-1, Akt1 et Rb1 est analysée par RT-PCR-quantitative. Les valeurs obtenues pour chaque gène sont rapportées à la valeur obtenue pour le 18S. Pour chaque gène, la valeur du contrôle est définie à 1. Les valeurs représentées sont les moyennes de deux expériences indépendantes.

D'après les résultats obtenus, la quantité d'ARNm de Gata-1, Fog-1 et Akt1 ne semble pas varier de manière significative entre les embryons contrôles et gata-1-S310A. L'histogramme représentant l'expression de Fog-1 donne l'impression d'une augmentation dans les embryons gata-1-S310A, mais l'analyse statistique indique qu'elle n'est pas significative (p=0,109). Un plus grand nombre d'échantillons sera nécessaire pour évaluer correctement ce gène. Toutefois, comme nous avons observé par Western Blot une diminution de la quantité de FOG-1, nous pouvons poser l'hypothèse d'une régulation post-transcriptionnelle pour cette protéine. En ce qui concerne GATA-1, nous n'avions pas observé de différence au niveau protéique et ce résultat est retrouvé au niveau des ARNm.

L'expression de Rb1 semble par contre augmenter de manière significative dans les embryons gata-1-S310A. La protéine pRb est essentielle à l'érythropoïèse. L'augmentation de son expression pourrait jouer un rôle dans les mécanismes de compensation mis en place chez les souris gata-1-S310A.

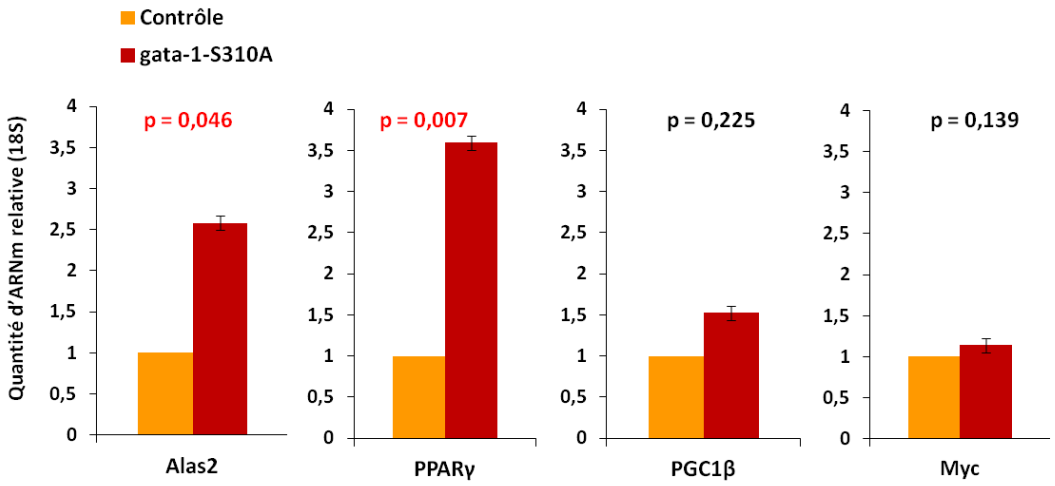


Figure 61 : <u>Les expressions d'Alas2 et de PPARγ semblent être augmentées dans les foies fœtaux gata-1-S310A</u>
L'ARN des cellules de foies fœtaux contrôle et gata-1-S310A est extrait et l'expression d'Alas2, PPARγ, PGC1β et Myc est analysée par RT-PCR-quantitative. Les valeurs obtenues pour chaque gène sont rapportées à la valeur obtenue pour le 18S. Pour chaque gène, la valeur du contrôle est définie à 1. Les valeurs représentées sont les moyennes de deux expériences indépendantes.

Nous avons également étudié l'expression d'Alas2 (**Figure 61**). Alas2 code pour une enzyme participant à la biosynthèse de l'hème. L'expression d'Alas2 dans les embryons gata-1-S310A semble être significativement supérieure au contrôle. L'augmentation de la production d'hème semble cohérente avec l'accélération de la différenciation érythroïde observée par cytométrie dans les foies fœtaux gata-1-S310A.

Nous observons également une augmentation significative de l'expression de PPARγ dans les foies fœtaux gata-1-S310A. PPARγ est un facteur de transcription impliqué dans le métabolisme des

lipides, mais également du glucose. Il permet en effet l'augmentation insulino-dépendante de l'incorporation du glucose (pour revues : Debril et al., 2001; Picard and Auwerx, 2002), et sa suppression diminue cette incorporation en affectant les transporteurs GLUT-1 et GLUT-4 (Liao et al., 2007). La signalisation IGF-1 est elle-même impliquée dans le métabolisme du glucose. De plus, les agonistes de PPARγ ont été impliqués dans la signalisation IGF-1 (Belfiore et al., 2009). L'augmentation de PPARγ dans les foies fœtaux gata-1-S310A pourrait alors être un effet de l'activation de la voie IGF-1.

Par contre, l'expression de PGC1β, un coactivateur de PPARγ, ne semble pas varier dans les embryons gata-1-S310A. L'expression de l'oncogène Myc ne semble pas varier non plus.

Cette étude préliminaire et non-exhaustive montre des variations de l'expression de certains gènes dans les foies fœtaux des souris gata-1-S310A, qui pourraient potentiellement être impliqués dans les mécanismes de compensation mis en place chez ces souris. Une étude plus approfondie sera nécessaire pour confirmer ces résultats.

4.3. Les souris gata-1-S310A adultes ne présentent pas de défauts majeurs de l'érythropoïèse en condition homéostatique à 12 semaines. Qu'en est-il pour des animaux plus âgés ?

Nous avons vu que les anomalies majeures de l'érythropoïèse pouvaient être révélées chez les souris gata-1-S310A par l'inhibition pharmacologique de la voie IGF-1. Or, on sait que le taux sérique d'IGF-1 diminue avec l'âge (Ruiz-Torres and Soares de Melo Kirzner, 2002). De plus, les défauts hématologiques, et en particulier les anémies, sont fréquents chez les animaux âgés (Harrison, 1975; Sudo et al., 2000). A la fin de ma thèse, nous disposions dans notre élevage de quelques animaux âgés de 40 semaines. Afin de détecter une éventuelle activation de l'érythropoïèse de stress, nous avons analysé le poids des rates de ces souris en comparaison avec celui de souris de 12 semaines (**Figure 62**).

Nous pouvons tout d'abord remarquer que le poids des souris augmente d'environ 1,5 fois avec l'âge dans les deux cohortes (**Fig62A**). Lorsque l'on compare les poids des rates, on remarque que, pour les souris contrôle, il augmente avec l'âge de manière significative. Il en est de même pour les souris gata-1-S310A. Le poids des rate des souris gata-1-S310A de 40 semaines est cependant plus élevé que celui des souris contrôle au même âge (**Fig62B**). Lorsque l'on calcule le rapport entre le poids de la rate et celui des souris, on observe chez les souris gata-1-S310A âgées de 40 semaines une différence significative de ratio avec les souris contrôle du même âge mais également avec les souris gata-1-S310A plus jeunes (**Fig62C**). **Il semblerait donc que les souris gata-1-S310A âgées montrent les signes d'une splénomégalie.** Des études complémentaires du taux sérique de l'IGF-1 et

de l'érythropoïèse de ces souris permettront de définir si cette splénomégalie est due à une anémie liée à l'âge et à l'activation d'une érythropoïèse de stress chez ces souris.

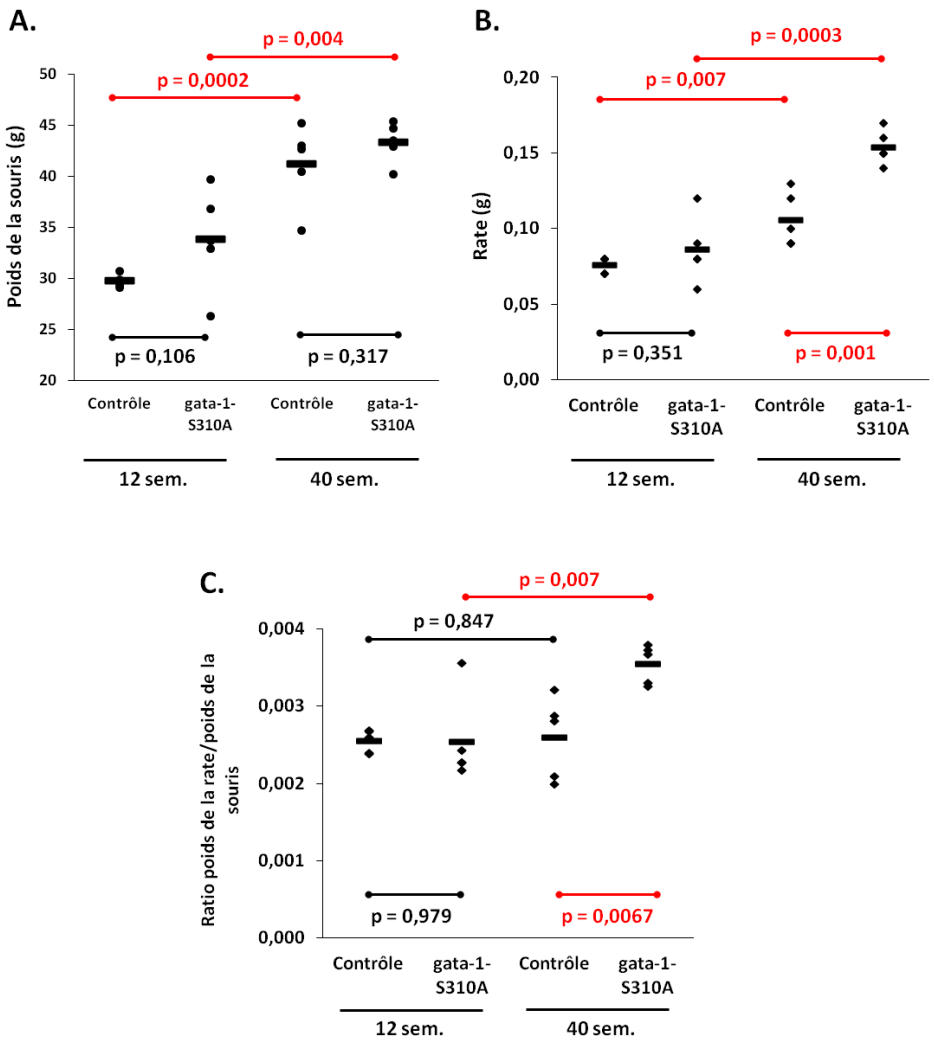


Figure 62 : <u>Le poids de la rate des souris gata-1-S310A augmente avec l'âge</u>
A. Des souris contrôle et gata-1-S310A âgées de 12 et 40 semaines ont été pesées. **B.** Les rates de ces souris ont été pesées. **C.** Le poids de la rate est rapporté au poids total de la souris pour chaque individu. Les ratios sont représentés sur le graphique. Les probabilités p sont calculées par un test de Student. Les valeurs significatives sont indiquées en rouge.

4.4. <u>Si les souris gata-1-S310A présentent un défaut de l'érythropoïèse, quel est le potentiel de reconstitution hématopoïétique des cellules souches de ces souris ?</u>

Il a été décrit que la voie de signalisation PI3K/Akt était impliquée dans le maintien des cellules souches hématopoïétiques (pour revues : Buitenhuis and Coffer, 2009; Buitenhuis, 2011; Polak and Buitenhuis, 2012). Bien que GATA-1 ne soit pas exprimé par les cellules souches, nous avons voulu examiner le potentiel de reconstitution hématopoïétique des cellules issues de souris gata-1-S310A pour potentiellement mettre en évidence un rôle extrinsèque de GATA-1 sur les cellules souches

hématopoïétiques. Par ailleurs, ce modèle de transplantation nous permettra également d'étudier la dynamique de l'érythropoïèse dans un contexte où seules les cellules transplantées possèdent le gène muté. Nous pourrons ainsi évaluer le rôle intrinsèque de cette mutation.

Pour évaluer la capacité de reconstitution hématopoïétique des cellules gata-1-S310A, nous avons choisi de mettre en compétition des cellules de moelle de souris gata-1-S310A avec des cellules de souris contrôles au sein d'une même souris contrôle (**Figure 63**).

Pour cela, la moelle de souris mâles gata-1-S310A et contrôles a été prélevée et les cellules Lin- (Lineage-) ont été récupérées par tri magnétique. Pour pouvoir différencier facilement les cellules contrôles des cellules gata-1-S310A lors de l'analyse, nous avons choisi de marquer ces cellules par des vecteurs codant pour des protéines fluorescentes. Ainsi, les cellules Lin- récupérées ont été transduites par un vecteur lentiviral exprimant soit la GFP, soit le mCherry (**Figure 63**). Les cellules Lin- transduites sont alors transplantées dans les deux cohortes préalablement irradiées (2 x 5,5Gy) de la manière suivante :

- les cellules contrôles-GFP et les cellules gata-1-S310A-mCherry sont poolées en quantité équivalentes (150.10^3 cellules au total) puis injectées aux quatre souris de la première cohorte ;
- les cellules contrôles-mCherry et les cellules gata-1-S310A-GFP sont poolées en quantité équivalentes (150.10^3 cellules au total) puis injectées aux quatre souris de la seconde cohorte.

Afin d'éviter un biais dans la compétition, nous avons veillé à transduire les cellules contrôles et gata-1-S310A de la même manière et avec la même efficacité pour les deux vecteurs exprimant la GFP et le m-cherry : on obtient dans les deux cas 60% de transduction pour les deux types de cellules.

Un mois après transplantation, les cellules sanguines des souris des deux cohortes ont été analysées par cytométrie en flux pour déterminer dans quelle proportion les cellules contrôles vs gata-1-S310A ont reconstitué l'hématopoïèse.

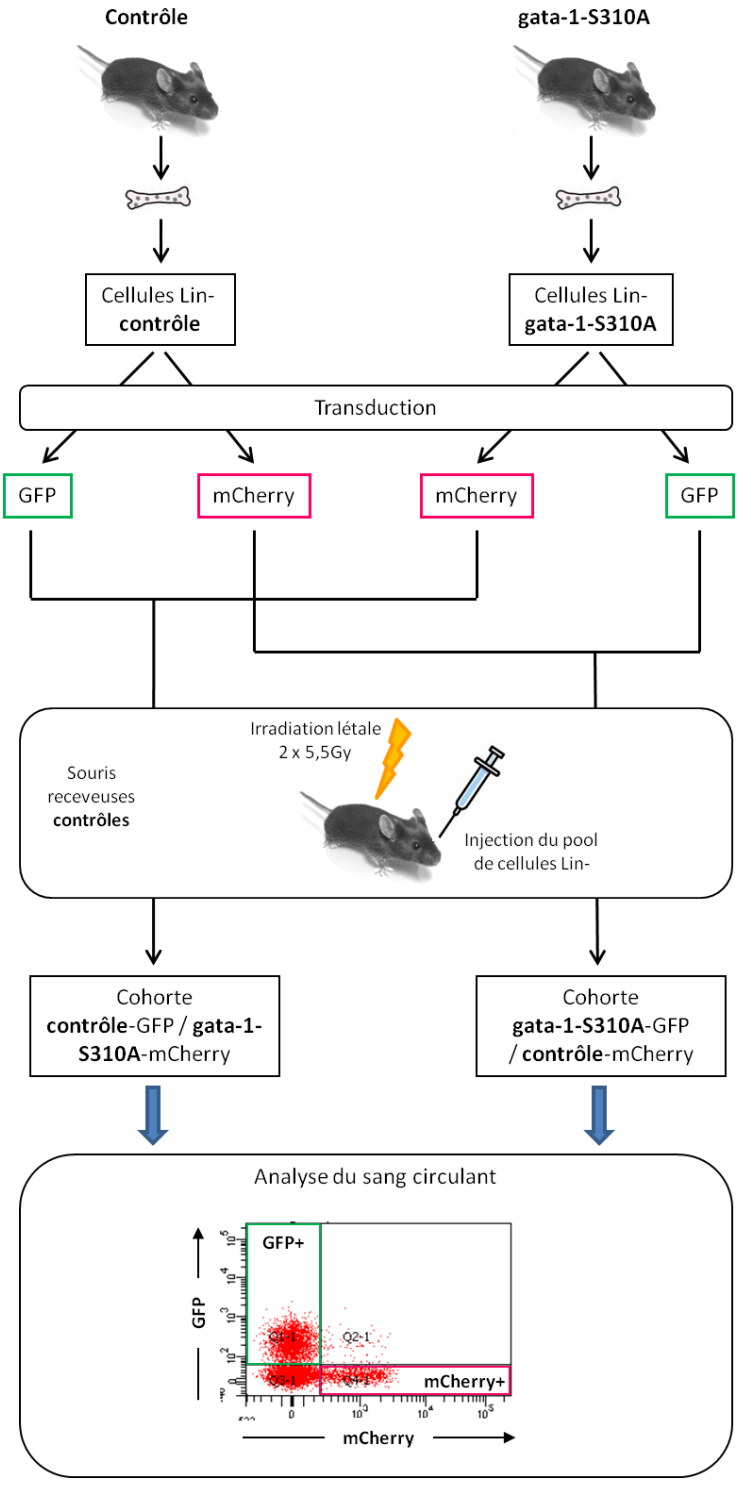


Figure 63 : <u>Mise en compétition des cellules contrôle vs gata-1-S310A pour la reconstitution hématopoïétique – protocole expérimental</u>

La moelle de mâles contrôle et gata-1-S310A est prélevée puis les cellules Lineage- sont récupérées par tri magnétique. Les deux types de cellules sont alors transduites par des vecteurs lentiviraux codant la GFP ou le mCherry (pTrip-mnd-GFP ou pTrip-mnd-mCherry). Pour chaque condition, le taux de transduction obtenu est d'environ 60%. 75.10^3 cellules contrôles-GFP sont poolées à 75.10^3 cellules gata-1-S310A-mCherry, et 75.10^3 cellules gata-1-S310A-GFP sont poolées à 75.10^3 cellules contrôles-mCherry. Chaque pool (150.10^3 cellules) est alors transplanté par injection intraveineuse (voie rétro-orbitale) dans un groupe de quatre souris mâles contrôles préalablement irradiés (2x 5,5Gy). Un mois après transplantation, le sang circulant des souris des deux cohortes est analysé par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules GFP+ (rectangle vert) d'une part, et mCherry+ (rectangle rose) d'autre part, est déterminé comme indiqué.

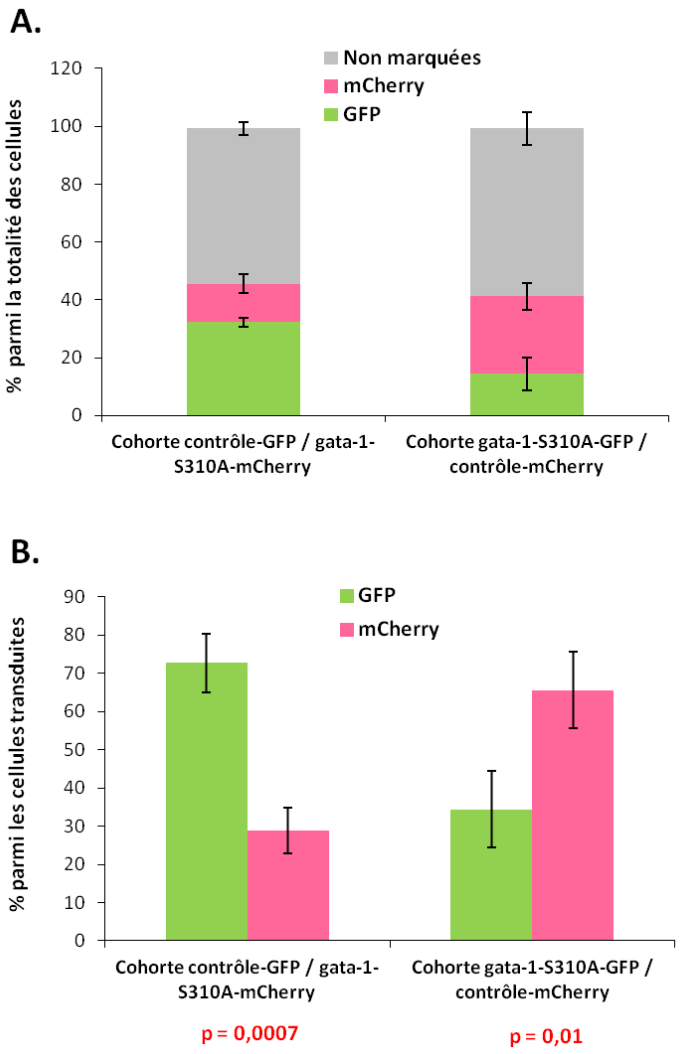


Figure 64 : <u>La reconstitution hématopoïétique des cellules gata-1-S310A semble moins efficace que celle des cellules contrôles</u>

A. Un mois après transplantation, le chimérisme des souris des deux cohortes est déterminé par analyse du sang circulant en cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules circulantes GFP-positives (vert), mCherry-positives (rose) ou non marquées (gris) parmi la totalité des cellules est mesuré par cytométrie pour chaque individu des deux cohortes. Les moyennes sont représentées dans le graphique. **B.** Pour chaque individu, le pourcentage de cellules GFP-positives et mCherry-positives est rapporté au pourcentage de cellules marquées. Les moyennes sont représentées.

Dans chacune des cohortes, les pourcentages de cellules GFP+/mCherry- (GFP), de cellules mCherry+/GFP- (mCherry) et de cellules double-négatives (non marquées) ont été déterminés. Les moyennes des valeurs obtenues sont représentées dans la **Figure 64A**. Pour chaque cohorte, on note une proportion équivalente (environ 55%) de cellules non marquées. Ces cellules proviennent certainement de la fraction non transduite des cellules Lin- transplantées, et non d'une repopulation résiduelle des cellules de l'hôte car dans ce cas le pourcentage aurait été plus variable. Dans la cohorte contrôle-GFP/gata-1-S310A-mCherry, on observe une proportion plus importante de cellules GFP que de cellules mCherry (32,3% GFP vs 13,2% mCherry). A l'inverse, dans la cohorte gata-1-S310A-GFP/contrôle-mCherry, on observe une proportion plus importante de cellules mCherry

(14,5% GFP vs 26,8% mCherry). Dans les deux cas, il semble donc y avoir une proportion plus importante de cellules contrôles que de cellules gata-1-S310A dans la circulation sanguine. Si l'on considère les proportions de cellules GFP et mCherry uniquement par rapport à la quantité totale de cellules marquées (définie comme 100%), on obtient les résultats présentés **Figure 64B**. Dans la première cohorte, 72,7% en moyenne des cellules marquées sont des cellules contrôles (GFP+), contre 27,3% pour les cellules gata-1-S310A (mCherry). La différence observée est hautement significative. Pour la seconde cohorte, on observe également une plus grande proportion de cellules contrôles (mCherry+ 65,6%) que de cellules gata-1-S310A (GFP+ 34,4%).

En conclusion, les résultats préliminaires obtenus à un mois post-transplantation montrent que la reconstitution des cellules souches gata-1-S310A semble moins efficace que celle des contrôles. Cependant, ces résultats restent à confirmer, notamment par l'analyse des différentes lignées hématopoïétiques. Afin de s'assurer que la faible proportion de cellules gata-1-S310A observée reflète bien un défaut des cellules souches et n'est pas due uniquement à un défaut de la lignée érythroïde, il est nécessaire d'analyser les proportions de cellules gata-1-S310A vs contrôles retrouvées dans les autres lignages hématopoïétiques.

Conclusion III

L'étude de l'érythropoïèse des souris gata-1-S310A montre, comme l'avait publié l'équipe d'Orkin, que chez l'adulte :

- les paramètres sanguins et le taux de réticulocytes sont normaux,
- les proportions des populations érythroïdes médullaires et spléniques semblent normales,
- et les capacités clonogéniques des progéniteurs médullaires sont équivalentes aux contrôles en conditions optimales de culture.

Cependant, nous avons observé, chez les souris gata-1-S310A, plusieurs éléments qui diffèrent des souris contrôles :

- l'étude de l'érythropoïèse fœtale a révélé une accélération de l'érythropoïèse au moment de la mise en place de l'érythropoïèse définitive (E11,5) ;
- la durée de vie des globules rouges des souris gata-1-S310A est deux fois plus courte que celle des contrôles ;
- les progéniteurs érythroïdes médullaires et fœtaux des souris gata-1-S310A montrent une dépendance accrue à l'insuline/IGF-1 et la transferrine *in vitro* ;
- les souris gata-1-S310A présentent un taux sérique d'IGF-1 supérieur à celui des souris contrôle.

Ces éléments suggéraient la mise en place, chez ces souris, d'un mécanisme de compensation impliquant l'IGF-1. Nous avons alors choisi d'étudier le rôle de la voie IGF-1 sur l'érythropoïèse des souris gata-1-S310A à l'aide d'un inhibiteur chimique.

L'inhibition de la voie IGF-1 a révélé la présence de défauts érythroïdes majeurs chez les souris gata-1-S310A. En effet, elle a déclenché, chez les souris gata-1-S310A, l'apparition de défauts morphologiques des globules rouges, suivie d'une anémie létale. Cette anémie était due à une hémolyse intra-vasculaire massive, additionnée d'une érythrophagocytose hépatique. Nous avons observé une augmentation de la production érythrocytaire médullaire, ainsi que l'activation d'une érythropoïèse de stress dans la rate. Nous avons alors conclu à une anémie hémolytique régénérative. En absence de signalisation IGF-1, la mutation gata-1-S310A conduit à la production d'érythrocytes morphologiquement anormaux et probablement non fonctionnels qui sont alors dégradés et lysés, conduisant à une anémie létale.

Ces résultats montrent, comme nous l'avons montré *in vitro* dans les chapitres précédents, que la phosphorylation de GATA-1 par Akt sur la Ser310 joue un rôle important dans la différenciation érythroïde. Son absence entraîne en effet des défauts érythroïdes majeurs conduisant à une anémie létale. Cependant, ces défauts peuvent être compensés *in vivo* par l'activation d'une voie de signalisation alternative. Ainsi, nous avons mis en évidence un mécanisme de compensation

permettant la survie des souris exprimant la protéine GATA-1-S310A non phosphorylable par Akt : la signalisation IGF-1.

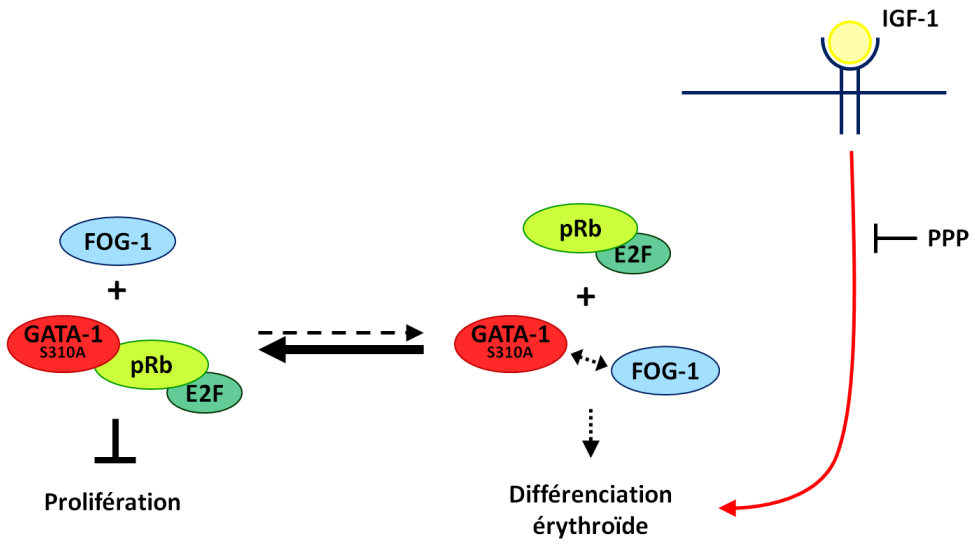


Figure 65 : L'absence de phosphorylation de GATA-1 entraîne des défauts érythroïdes compensés *in vivo* par l'IGF-1

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La balance prolifération/différenciation résulte d'un équilibre finement régulé indispensable à l'homéostasie de tout système dynamique. Dans ce travail, j'ai étudié l'équilibre entre les complexes GATA-1/FOG-1 (impliqué dans la différenciation) et GATA-1/pRb (impliqué dans la prolifération). J'ai mis en évidence un nouveau modèle d'équilibre moléculaire dans lequel la phosphorylation de GATA-1 sur la Sérine 310 est le rhéostat de la formation de ces deux complexes.

J'ai ensuite étudié deux modèles où la phosphorylation de GATA-1 est abrogée :

a) le modèle GATA-1-V205G *in vitro* où la phosphorylation de la Ser310 est fortement diminuée. Dans ce cas, la différenciation érythroïde peut être restaurée en jouant sur les acteurs de cet équilibre (phosphorylation constitutive de GATA-1-V205G et augmentation de la quantité de la protéine FOG-1) ;

b) le modèle de souris gata-1-S310A *in vivo* dans lequel nous avons mis en évidence l'implication de l'IGF-1 comme acteur central d'un mécanisme de compensation.

J'organiserai ce chapitre de discussion autour de deux grands points :

- « au niveau de la cellule » : comment la phosphorylation de GATA-1 peut-elle réguler la balance prolifération/différenciation ? Dans ce paragraphe, je discuterai des résultats au niveau moléculaire de l'analyse des complexes et des mutants GATA-1-S310A et GATA-1-V205G ;
- « au niveau de l'organisme entier » : quel est le rôle de la voie IGF-1 dans l'érythropoïèse des souris gata-1-S310A ?

1. Comment la phosphorylation de GATA-1 par Akt régule-t-elle la balance entre prolifération et différenciation érythroïde ?

Au début de mon travail de thèse, plusieurs questions se posaient : quel est le rôle moléculaire de la phosphorylation de GATA-1 ? Comment agit-elle sur la différenciation érythroïde ? Quels sont les mécanismes régulant l'équilibre moléculaire entre les complexes GATA-1/pRb/E2F et GATA-1/FOG-1 et la balance entre prolifération et différenciation érythroïde ?

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont montré que la phosphorylation de GATA-1 par Akt régule la balance entre prolifération et différenciation érythroïde :

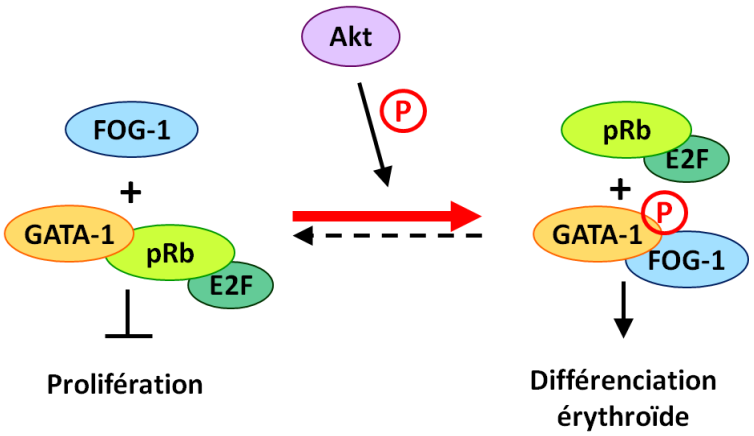


Illustration 28 : La phosphorylation de GATA-1 par Akt régule la balance entre prolifération et différenciation érythroïde

En effet, nous avons montré que la phosphorylation de GATA-1 augmente son affinité pour FOG-1. Elle permet ainsi d'une part la dissociation du complexe GATA-1/pRb/E2F et la reprise du cycle cellulaire, et d'autre part l'association GATA-1/FOG-1 et l'induction de la différenciation érythroïde.

Cependant, ces résultats amènent plusieurs questions :

Comment la phosphorylation de GATA-1 augmente-t-elle l'affinité GATA-1/FOG-1 ?

Quel est l'impact de la phosphorylation de la Ser310 sur la fonction transcriptionnelle de GATA-1 ?

Quel est l'impact de la phosphorylation sur la différenciation érythroïde terminale ?

1.1. Comment la phosphorylation de GATA-1 par Akt augmente-t-elle l'affinité GATA-1/FOG-1 ?

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle consistant à ajouter un groupement phosphate (PO_3^-) à un résidu Ser, Thr ou Tyr d'une protéine. Par l'apport d'une charge négative, la phosphorylation modifie l'environnement local de la protéine. Cela peut conduire à des modifications de la conformation de la protéine, comme c'est le cas pour les kinases telles que Akt ou CDK2 (Russo et al., 1996; Yang et al., 2002). Dans le cas du facteur de transcription CREB (cyclic AMP response element-binding protein), le premier facteur de transcription pour lequel on a montré que son activité était régulée par phosphorylation/déphosphorylation (Gonzalez and Montminy, 1989), la phosphorylation de la Ser133 permet le recrutement du coactivateur CBP (CREB binding protein), conduisant à son activation transcriptionnelle (Mayr and Montminy, 2001). Les études

structurales ont montré que la phosphorylation permet la formation d'une liaison hydrogène entre la phosphosérine 133 de CREB et la Tyr658 de CBP.

En ce qui concerne GATA-1, nous avons montré que la phosphorylation de la Ser310 augmente l'affinité pour FOG-1. Cependant, la Ser310 ne fait pas partie du domaine d'interaction avec FOG-1. Il s'agit alors d'un mécanisme différent de celui de CREB. La phosphorylation n'intervient pas directement dans l'interaction GATA-1/FOG-1. C'est sans doute pour cette raison qu'elle n'est pas indispensable à la formation du complexe, mais régule simplement son affinité. Il est alors probable que la phosphorylation sur la Ser310 entraîne une modification de la conformation de la protéine, facilitant ainsi l'accès de FOG-1.

Comment la phosphorylation de la Ser310 modifie-t-elle la structure de GATA-1 ? Pour répondre à cette question, il faudrait disposer des structures tridimensionnelles des formes phosphorylée et non phosphorylée de GATA-1. La résolution de structures protéiques peut s'effectuer par cristallographie aux rayons X ou spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN). Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure de réaliser une telle étude. Cependant, l'analyse des structures existantes des domaines de la protéine GATA-1 peut nous permettre d'élaborer une hypothèse quant au rôle de la phosphorylation sur la Ser310 dans l'interaction avec FOG-1.

A ce jour, seules les structures des deux doigts de zinc de GATA-1 ont été résolues. Kowalski et coll. ont résolu la structure du doigt de zinc N-terminal, qui comprend le domaine d'interaction avec FOG-1, de la protéine GATA-1 murine (PDB ID : 1gnf) (Kowalski et al., 1999). La séquence étudiée comprend les AA198-243. Plus récemment, cette structure a été utilisée par Liew et coll. pour déterminer la structure de l'interaction GATA-1/FOG-1 (PDB ID : 1y0j) (Liew et al., 2005). Ils ont en effet défini la structure du complexe formé par le doigt de zinc N-terminal de la protéine GATA-1 murine (GNF) et le premier doigt de zinc de la protéine dFOG (U-shaped) de drosophile (dFOG-F1). dFOG-F1 possède 63% d'homologie avec le ZF9 de la protéine FOG-1 murine, et il interagit avec le doigt de zinc de la protéine Pannier (facteur GATA de drosophile) qui possède 87% d'homologie avec le doigt de zinc N-terminal de GATA-1 murin. De plus, les auteurs ont montré précédemment que le doigt de zinc N-ter de GATA-1 murin était capable d'interagir avec les doigts de zinc 1, 5 et 9 de dFOG (Fox et al., 1999).

Dans cette étude, les auteurs montrent que le doigt de zinc N-terminal de GATA-1 est capable d'interagir simultanément avec l'ADN et FOG-1 via deux domaines opposés. Comme le montre l'**illustration 29**, les résidus mauves représentent le domaine de liaison à l'ADN, tandis les résidus gris du côté opposé sont impliqués dans l'interaction avec FOG-1.

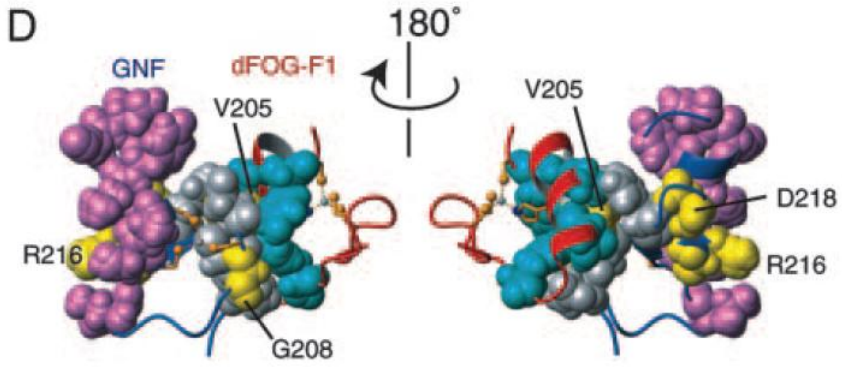


Illustration 29 : <u>Structure de l'interaction GATA-1/FOG-1</u> (Liew et al., 2005)
GNF : domaine N-terminal de la protéine GATA-1 murine ; **zone mauve** : domaine d'interaction de GATA-1 avec l'ADN ; **zone grise** : domaine d'interaction de GATA-1 avec FOG-1 ; **zones jaunes** : mutations du doigt de zinc N-terminal de GATA-1 ; **dFOG-F1** : premier doigt de zinc de la protéine dFOG de drosophile ; **zone bleue** : domaine de FOG-1 interagissant avec GATA-1.

Tjandra et coll. ont défini la structure du doigt de zinc C-terminal de la protéine GATA-1 de poulet complexé à l'ADN (PDB ID : 2gat) (Tjandra et al., 1997). La séquence protéique étudiée est homologue aux résidus 252-317 des protéines GATA-1 humaine et murine. Elle comprend donc la Ser310. D'après cette structure, le doigt de zinc C-ter interagit avec la double hélice d'ADN, tandis que l'extrémité C-terminale contenant la Ser310 contourne l'hélice. La Ser310 est alors située du côté de l'hélice opposé au doigt de zinc C-ter (**Illustration 30**).

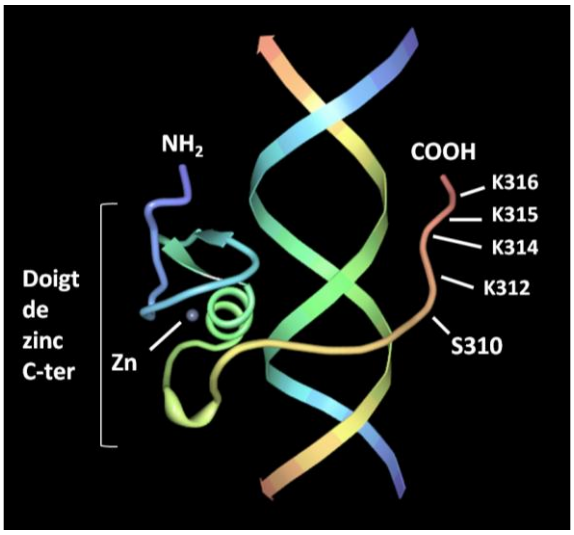


Illustration 30 : <u>Représentation tridimensionnelle du doigt de zinc C-terminal de la protéine GATA-1 de poulet lié à la double hélice d'ADN</u>
La figure a été réalisée à partir du fichier 2gat (Tjandra et al., 1997) à l'aide du logiciel Simple Viewer disponibles sur le site de la Protein Data Bank (http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do). La sérine 310 et les résidus du domaine riche en Lysine (K) sont indiqués.

D'après ces deux structures, nous pouvons imaginer que les deux doigts de zinc de GATA-1 forment une boucle autour de l'ADN et se lient chacun d'un côté de l'hélice. Dans ce cas, la Ser310, située du coté opposé au doigt de zinc C-ter, serait à proximité du doigt de zinc N-ter, donc de la

zone d'interaction avec FOG-1. Cela pourrait expliquer l'influence de la phosphorylation de cette Sérine sur l'interaction GATA-1/FOG-1 (**Illustration 31**).

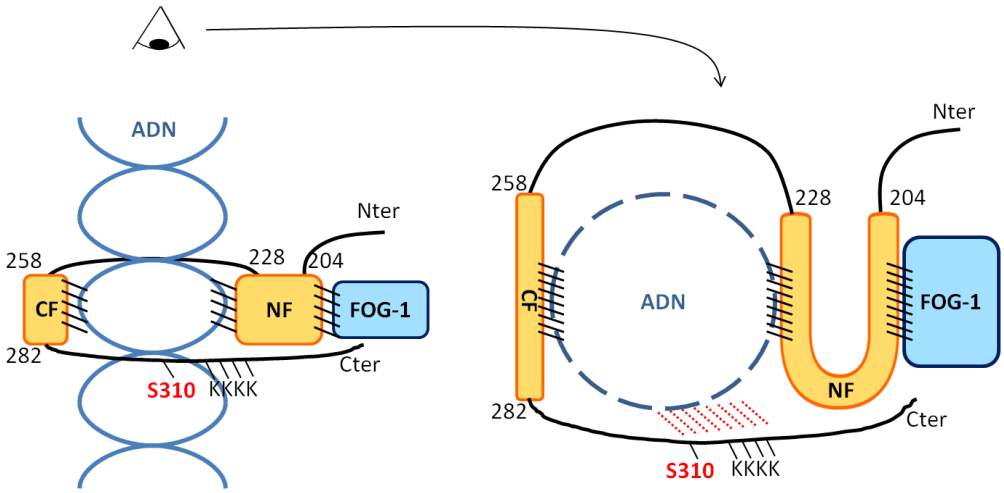


Illustration 31 : <u>Hypothèse d'interaction conjointe ADN/GATA-1/FOG-1</u>
L'interaction ADN/GATA-1/FOG-1 est représentée selon deux angles de vue différents : la partie droite correspond à la partie gauche vue du dessus. La protéine GATA-1 interagit avec l'ADN via ses deux doigts de zinc (CF et NF) situés de chaque côté de l'hélice. Les hachures noires représentent les interactions des doigts de zinc de GATA-1 avec l'ADN et/ou FOG-1. Les hachures rouges pointillées représentent le rapprochement entre la zone de GATA-1 contenant la Ser310 et le domaine riche en Lysine (KKKK), chargée positivement, et l'hélice d'ADN chargée négativement. **CF** : doigt de zinc C-terminal de GATA-1 ; **NF** : doigt de zinc N-terminal de GATA-1.

La région contenant la Ser310 est constituée d'acides aminés hydrophiles et d'acides aminés basiques chargés positivement. Cette concentration de charges positives peut expliquer le rapprochement de cette zone de la protéine vers la double hélice d'ADN chargée négativement. L'apport d'une charge négative par la phosphorylation pourrait déstabiliser ce rapprochement. Si l'on suppose que le doigt de zinc N-ter interagit avec l'ADN à proximité de la région contenant la Ser310, on peut imaginer qu'en absence de phosphorylation, cette proximité encombre la zone d'interaction avec FOG-1 du doigt de zinc N-ter. Dans ce cas, la phosphorylation de la Ser310, par l'apport d'une charge négative, éloignerait la région de la Ser310 de l'ADN et libèrerait l'accès au doigt de zinc N-ter pour FOG-1.

Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait déterminer la structure du complexe GATA-1+ADN+FOG-1, en utilisant une séquence de GATA-1 comprenant les deux doigts de zinc ainsi que la Ser310 (par exemple les résidus 198-317). En réalisant cette étude avec les mutants de phosphorylation de GATA-1, nous pourrions ainsi évaluer l'effet de la phosphorylation de la Ser310 sur la structure de ce complexe.

La zone de la Ser310 est également riche en Lysine et comprend un site d'acétylation (312-316). Ce site d'acétylation joue un rôle important dans la différenciation érythroïde. En effet, si la mutation des résidus 312-316 n'a pas d'effet sur la liaison de GATA-1 à l'ADN (Hung et al., 1999), elle diminue

en revanche l'occupation de la chromatine par GATA-1 sur ses gènes cibles (Lamonica et al., 2006). Comme la phosphorylation, l'acétylation consiste également à apporter une charge négative. Elle neutralise ainsi la charge positive des résidus Lys. On peut alors imaginer un effet synergique de la phosphorylation et de l'acétylation de la zone 310-316 pour éloigner cette région de la protéine de la molécule d'ADN. Un tel effet synergique entre ces deux modifications post-traductionnelles a été montré dans le cas des histones. On peut citer en exemple la phosphorylation et l'acétylation de l'histone H3 qui sont couplées pour activer l'expression des gènes de manière synergique en réponse à l'EGF (Cheung et al., 2000).

D'autre part, une modélisation intégrant à la fois la Val205 et la Ser310 pourrait permettre d'expliquer l'absence de phosphorylation de la protéine GATA-1-V205G. En effet, nous avons montré, dans un modèle non érythroïde, qu'en condition de stimulation par le PDGF, la protéine GATA-1-V205G n'est pas phosphorylée sur la Ser310 malgré l'activation d'Akt. Pourquoi ?

L'étude de Liew et coll. montre que la mutation V205M perturbe la structure tertiaire du doigt de zinc N-terminal (Liew et al., 2005). Les mutations G208S, D218G et D218Y, abrogeant également l'interaction avec FOG-1, ont le même effet sur la structure tertiaire du doigt de zinc. Ces séquences mutées existeraient en solution sous forme de globule fondu (état stable intermédiaire entre l'état dénaturé et l'état natif d'une protéine) possédant une structure secondaire, mais pas de structure tertiaire bien définie. On peut supposer que la mutation V205G perturbe également la structure tertiaire du doigt de zinc N-terminal. Bien que l'on ne connaisse pas l'effet de ces mutations sur la structure de la protéine entière, il est raisonnable de penser que si la structure tertiaire du doigt de zinc est modifiée, la structure de la protéine entière doit l'être également. Cette modification de la structure pourrait alors interférer dans la liaison de la kinase à GATA-1-V205G ou rendre la Ser310 inaccessible, et empêcher ainsi la phosphorylation de GATA-1-V205G par Akt. Dans ce cas, si l'absence de phosphorylation de GATA-1-V205G est due à la déstructuration de la protéine, on peut alors supposer que les autres mutants d'interaction (G208S, D218G et D218Y) ne sont pas non plus phosphorylés par Akt.

Une autre hypothèse serait que la mutation V205G interfère avec la localisation subcellulaire de GATA-1. La kinase Akt est localisée majoritairement dans le cytoplasme. Si l'on suppose que la phosphorylation de GATA-1 par Akt est cytoplasmique, la translocation de GATA-1 dans le cytoplasme serait alors nécessaire. Le blocage de cette translocation par la mutation V205G expliquerait l'absence de phosphorylation de cette protéine. Cependant, la localisation nucléaire d'Akt a également été montrée (Ahmed et al., 1993; Meier et al., 1997). De plus, Akt phosphoryle plusieurs de ses cibles dans le noyau comme les facteurs FoxO (Biggs et al., 1999). GATA-1 étant un facteur de transcription, il est probable que sa phosphorylation par Akt soit nucléaire. De plus, il a été

montré que l'Epo induit la translocation nucléaire d'Akt activé dans les cellules érythroleucémiques K562. Cette translocation semble importante pour la différenciation érythroïde Epo-dépendante de ces cellules (Missiroli et al., 2009). Nous pouvons alors supposer que la phosphorylation de GATA-1 par Akt est nucléaire. L'absence de phosphorylation de GATA-1-V205G ne serait alors pas due à un défaut de localisation subcellulaire de la protéine.

Si la phosphorylation augmente l'affinité de GATA-1 pour FOG-1, la phosphorylation constitutive de GATA-1-V205G (GATA-1-V205G-S310D) est-elle capable de restaurer son affinité pour FOG-1 ? Nous avons montré que la protéine GATA-1-V205G-S310D restaure la différenciation érythroïde *in vitro*. Si l'effet physiologique est restauré, nous pouvons alors supposer, bien que nous ne l'ayons pas montré, que l'interaction avec FOG-1 est également restaurée. Cependant, dans le cas de la sumoylation, Lee et coll. ont montré que l'ajout d'un groupement SUMO à la protéine GATA-1-V205G restaurait la transcription de gènes érythroïdes et le recrutement de FOG-1 à la chromatine mais ils ne détectent pas d'augmentation de l'interaction avec FOG-1 (Lee et al., 2009). De plus, nous avons vu que la protéine GATA-1-V205G-S310D avait un comportement équivalent à la protéine GATA-1-S310A : elle induit une différenciation érythroïde partielle. Or, nous avons montré que, dans un modèle reconstitué, l'interaction GATA-1-S310A/FOG-1 de faible affinité n'est détectée que lorsque la quantité de FOG-1 est augmentée. Nous pouvons alors supposer que l'interaction GATA-1-V205G-S310D/FOG-1 ne serait également détectable qu'en présence d'une quantité importante de FOG-1. Il serait intéressant, pour appuyer notre hypothèse, de déterminer les constantes d'association des protéines GATA-1-WT, GATA-1-S310A et GATA-1-V205G-S310D à FOG-1 par un système Biacore ou de calorimétrie isotherme à titration (ITC).

Ainsi, nous supposons que la phosphorylation constitutive de la protéine GATA-1-V205G restaure une faible affinité pour FOG-1. Sachant que GATA-1-V205G n'a aucune affinité pour FOG-1, notre hypothèse expliquant l'effet de la phosphorylation de la Ser310 sur l'affinité GATA-1/FOG-1 permet-elle d'expliquer ce phénomène ?

La Val205 est l'un des acides aminés cruciaux impliqués dans l'interaction du doigt de zinc N-terminal de GATA-1 avec le doigt de zinc de FOG-1. Elle a une position centrale sur la zone du doigt de zinc qui interagit avec FOG-1. Lors de l'interaction, elle se loge dans une cavité sur la surface du doigt de zinc de FOG-1. Elle est alors située en plein cœur du complexe. Dans la protéine GATA-1-V205M, la Méthionine, dont la chaîne latérale est plus grande, ne peut pas occuper cette cavité. Cela explique l'absence d'interaction de la protéine GATA-1-V205M avec FOG-1 (Liew et al., 2005). Dans le cas de la protéine GATA-1-V205G, on aurait pu penser que, la Glycine étant un acide aminé plus petit ne possédant pas de chaîne latérale, l'interaction aurait été possible. Cependant, la protéine GATA-1-

V205G n'interagit pas non plus avec FOG-1. Il est possible que la suppression de la chaîne latérale hydrophobe de la Valine perturbe également l'interaction. Mais nous pouvons également supposer que la présence de la Glycine diminue simplement l'affinité pour FOG-1 et que l'absence de phosphorylation de cette protéine contribue à inhiber totalement l'interaction. Dans ce cas, il est logique que la phosphorylation constitutive restaure une affinité GATA-1-V205G/FOG-1. D'après notre hypothèse, l'extrémité C-terminale non phosphorylée de GATA-1 encombrerait la zone du doigt de zinc N-terminal impliquée dans l'interaction avec FOG-1. La phosphorylation constitutive de GATA-1-V205G permettrait de libérer l'accès de FOG-1 au doigt de zinc N-ter, restaurant ainsi une faible affinité pour FOG-1. On peut alors supposer que la Gly205 est capable d'occuper la cavité du doigt de zinc de FOG-1, malgré l'absence de chaîne hydrophobe, mais avec une plus faible affinité que la Valine. Obtiendrait-on le même résultat avec la mutation V205M ? Si la Méthionine n'est pas capable d'occuper la cavité du doigt de zinc de FOG-1 en raison de sa grande taille, la phosphorylation constitutive de GATA-1-V205M ne permettrait peut-être pas de restaurer une interaction avec FOG-1.

La résolution des structures de la séquence AA198-317, contenant les deux doigts de zinc et la Ser310, des protéines GATA-1-V205G, GATA-1-V205G-S310A et GATA-V205G-S310D pourraient permettre de documenter ces hypothèses.

1.2. La phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 permet la transcription d'une certaine catégorie de gènes

Dans notre étude, nous avons montré que la phosphorylation de la Ser310 par Akt augmente l'affinité de l'interaction GATA-1/FOG-1. Comme je l'ai mentionné dans l'introduction, l'interaction GATA-1/FOG-1 est nécessaire pour l'activation ou la répression d'un certain nombre de gènes cibles. Ainsi, nous avons supposé que la phosphorylation de GATA-1 était impliquée dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de GATA-1 par FOG-1. En effet, nous avons montré, par l'expression d'un gène rapporteur (luciférase) dans un système reconstitué, que la régulation de l'activité transcriptionnelle de GATA-1 par FOG-1 s'effectue de manière différentielle en fonction de l'état de phosphorylation de GATA-1. Plus la phosphorylation de GATA-1 est importante, plus la régulation par FOG-1 est effective.

De plus, cette étude a permis de mettre en évidence une régulation différentielle de la transcription par le complexe GATA-1/FOG-1 en fonction des cibles. En effet, les cibles transcriptionnelles de GATA-1 ont des sensibilités différentes à la présence du complexe GATA-1/FOG-1. Ainsi, parmi les promoteurs minimums que nous avons testés, les promoteurs de la glycophorine B (GpB95) et de l'Epo-R sont très sensibles. Lorsque GATA-1 n'est pas phosphorylé, la

faible affinité existant entre GATA-1-S310A et FOG-1 permet la formation d'une quantité de complexes suffisante pour induire une répression transcriptionnelle de ces promoteurs. A l'inverse, les promoteurs de la PBGD, de GATA-1 et le promoteur synthétique contenant 3 sites GATA sont moins sensibles. Ils nécessitent une quantité plus importante de complexes, donc une plus forte affinité entre GATA-1 et FOG-1, pour leur régulation transcriptionnelle.

Cependant, ces résultats sont à interpréter avec précaution. En effet, cette étude a été réalisée dans un modèle non érythroïde à l'aide de promoteurs minimaux. Dans ce système, l'expression de GATA-1 seul transactive les cinq promoteurs testés, et la présence de FOG-1 réprime cette activation. Or, on sait que dans un système érythroïde, le rôle de FOG-1 ne se limite pas uniquement à la répression de l'activité transcriptionnelle de GATA-1 (pour revue : Chlon and Crispino, 2012). En effet, la présence de FOG-1 est nécessaire à l'activation ou la répression par GATA-1 de nombreux gènes cibles (Crispino et al., 1999). Les résultats obtenus dans notre étude n'ont donc pas de réelle relevance physiologique et ne nous permettent pas de conclure sur la sensibilité des promoteurs testés, ni d'extrapoler au système érythroïde où le contexte est totalement différent. Par contre, ils montrent que ces cinq promoteurs répondent différemment à une situation équivalente. Nous pouvons alors conclure qu'il existe vraisemblablement des différences de sensibilité entre les gènes cibles de GATA-1. Les différents promoteurs répondent plus ou moins fortement à une même quantité de complexes GATA-1/FOG-1. En régulant l'affinité de GATA-1 pour FOG-1, la phosphorylation de GATA-1 par Akt permet de contrôler la quantité de complexes GATA-1/FOG-1 formés. Plus GATA-1 est phosphorylé, plus l'affinité de GATA-1 pour FOG-1 est forte, plus la quantité de complexes formés est importante. Ainsi, la phosphorylation de GATA-1 par Akt permet à un système binaire (interaction ou non de deux protéines) de réguler de manière différentielle une multitude de gènes en fonction de leur sensibilité (**Illustration 32**).

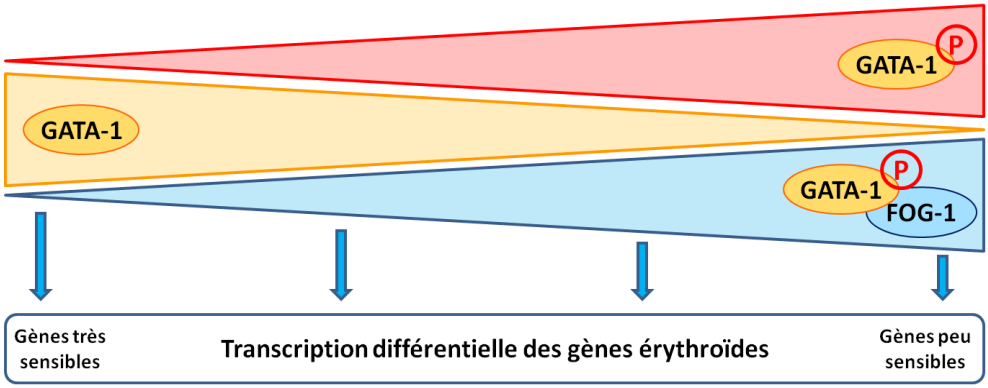


Illustration 32 : <u>Représentation schématique de la régulation différentielle de la transcription par le complexe GATA-1/FOG-1 en fonction de la phosphorylation</u>
L'affinité de GATA-1 pour FOG-1 et la quantité de complexes GATA-1/FOG-1 sont corrélées au niveau de phosphorylation de GATA-1. L'augmentation de l'affinité GATA-1/FOG-1 et de la quantité de complexes par la phosphorylation permet la régulation séquentielle des différents gènes érythroïdes en fonction de leur sensibilité. Ainsi, la phosphorylation de GATA-1 régule la transcription différentielle des gènes érythroïdes.

D'autre part, nous avons également montré que la phosphorylation de GATA-1 favorise la dissociation du complexe GATA-1/pRb/E2F. La dissociation de l'interaction GATA-1/pRb rend la protéine pRb accessible à la phosphorylation, ce qui permet la libération d'E2F et la reprise du cycle cellulaire. Ainsi, de même que pour la quantité de complexes GATA-1/FOG-1, la quantité de facteurs E2F libres est corrélée au niveau de phosphorylation de GATA-1. La phosphorylation de GATA-1 permet de contrôler la prolifération cellulaire via le contrôle de la transcription des gènes E2F-dépendants.

Ainsi, nous pouvons supposer que, selon le niveau de phosphorylation de GATA-1, une combinaison spécifique de gènes GATA-1/FOG-1-dépendants et de gènes E2F-dépendants sont activés (**Illustration 33**).

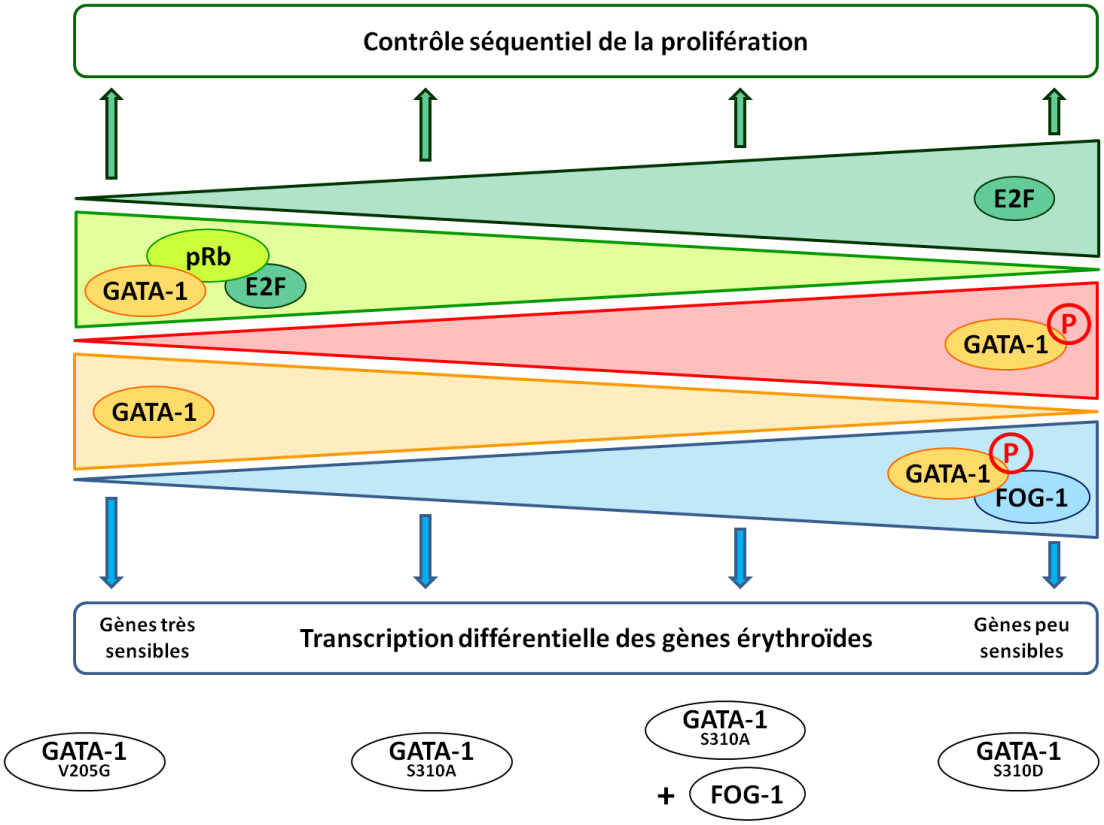


Illustration 33 : <u>Activation de différentes combinaisons de gènes par GATA-1/FOG-1 et E2F en fonction du niveau de phosphorylation de GATA-1</u>
La phosphorylation de GATA-1 régule l'apparition du complexe GATA-1/FOG-1 et la dissociation de GATA-1/pRb/E2F permettant la libération d'E2F. Elle contrôle ainsi la transcription des gènes GATA-1/FOG-1-dépendants et des gènes E2F-dépendants. La combinaison de ces gènes varie en fonction du niveau de phosphorylation.

Pour vérifier la cohérence de ce modèle, nous pouvons y replacer les différents mutants de GATA-1 en fonction de leur affinité pour FOG-1 et leur état de phosphorylation.

La protéine GATA-1-V205G n'est pas phosphorylée et ne forme pas de complexe avec FOG-1 : les gènes GATA-1/FOG-1-dépendants ne sont pas transcrits. Dans ce cas, E2F est totalement séquestré

dans le complexe GATA-1/pRb/E2F, ce qui est cohérent avec l'arrêt de prolifération observé lorsque GATA-1-V205G est exprimé dans les lignées NIH-3T3 et G1E (Kadri et al., 2009).

La protéine GATA-1-S310A n'est pas non plus phosphorylée par Akt. Toutefois, nous avons montré qu'elle est capable de former un complexe de faible affinité avec FOG-1. Ainsi, une faible quantité de complexes GATA-1-S310A/FOG-1 permet la transcription d'une certaine catégorie de gènes érythroïdes. Parallèlement, la majorité des protéines GATA-1-S310A sont complexées avec pRb et une faible quantité d'E2F est libérée, la prolifération est alors limitée. Ce modèle coïncide avec nos observations : malgré la présence de FOG-1, l'expression de GATA-1-S310A inhibe la prolifération des cellules NIH-3T3. Par contre, l'augmentation de la quantité de FOG-1 permet d'augmenter la formation de complexes GATA-1-S310A/FOG-1. Dans ce cas, la combinaison de gènes activés est différente : une catégorie différente de gènes érythroïdes est transcrite, et une plus grande quantité d'E2F permet une prolifération plus importante dans la lignée NIH-3T3 comme le montrent nos résultats.

Enfin, la protéine GATA-1-S310D est constitutivement phosphorylée : elle a une forte affinité pour FOG-1. Dans ce cas, le complexe GATA-1/pRb/E2F est dissocié et une grande quantité d'E2F est libre. Ceci est cohérent avec nos résultats indiquant que la protéine GATA-1-S310D permet la transcription de gènes érythroïdes peu sensibles et induit une forte prolifération en présence de FOG-1 dans les cellules NIH-3T3.

Ainsi, d'après notre modèle, la phosphorylation de GATA-1 régule l'apparition du complexe GATA-1/FOG-1, la disparition du complexe GATA-1/pRb/E2F et la libération d'E2F. De cette manière, elle contrôle la transcription d'une combinaison de gènes GATA-1/FOG-1-dépendants et de gènes E2F-dépendants. Cette combinaison varie en fonction du niveau de phosphorylation de GATA-1.

Une étude de la transcription des différents gènes cibles de GATA-1 dans les cellules G1E exprimant les différentes formes mutées de GATA-1 permettrait de définir plus précisément le rôle de la phosphorylation dans l'expression des différentes cibles. Nous pourrions ainsi classer ces différentes cibles en fonction de leur sensibilité/dépendance à une quantité plus ou moins importante de complexes GATA-1/FOG-1. De manière plus générale, une étude du transcriptome des cellules G1E exprimant les différentes formes mutées de GATA-1 permettrait de déterminer les différentes combinaisons de gènes GATA-1/FOG-1-dépendants et E2F-dépendants activés en fonction du niveau de phosphorylation de GATA-1.

1.3. La phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 est nécessaire pour les dernières étapes de la différenciation érythroïde

Pour déterminer l'impact de la phosphorylation de GATA-1 sur le processus de différenciation érythroïde, nous avons utilisé un modèle cellulaire : la lignée G1E. Les cellules G1E sont dérivées de cellules ES murines invalidées pour le gène *gata-1*. Elles sont engagées dans le lignage érythroïde mais sont bloquées dans leur maturation au stade proérythroblaste (Weiss et al., 1997). L'expression exogène de GATA-1 permet la reprise de la différenciation jusqu'au stade érythroblaste acidophile. Les cellules ne subissent pas de maturation terminale et entrent en apoptose avant l'énucléation. Toutefois, la lignée G1E représente un modèle de choix pour l'étude de la différenciation érythroïde terminale et en particulier du rôle de GATA-1 dans ce processus. Ce modèle a été utilisé dans de nombreuses études pour déterminer l'impact de différentes mutations de GATA-1 sur sa capacité à promouvoir la différenciation érythroïde terminale (Crispino et al., 1999; Kadri et al., 2009).

A partir du stade proérythroblaste, la poursuite de la différenciation érythroïde nécessite deux phénomènes concomitants : 1) un changement de type de cycle cellulaire permettant la sortie de l'auto-renouvellement, on passe des divisions « de renouvellement » qui augmentent le pool de progéniteurs en conservant le potentiel de différenciation, aux divisions « de différenciation » qui permettent à un proérythroblaste de devenir un érythrocyte ; 2) l'induction d'un programme de différenciation permettant l'acquisition des caractéristiques spécifiques et les modifications morphologiques conférant le phénotype érythroïde. Quel est l'impact de la phosphorylation de GATA-1 sur la coordination de ces deux évènements ?

D'après les données de la littérature et les résultats que nous avons obtenus, nous proposons le modèle suivant pour expliquer l'impact de la phosphorylation de GATA-1 sur la balance prolifération/différenciation au cours de l'érythropoïèse terminale (**Illustration 34**).

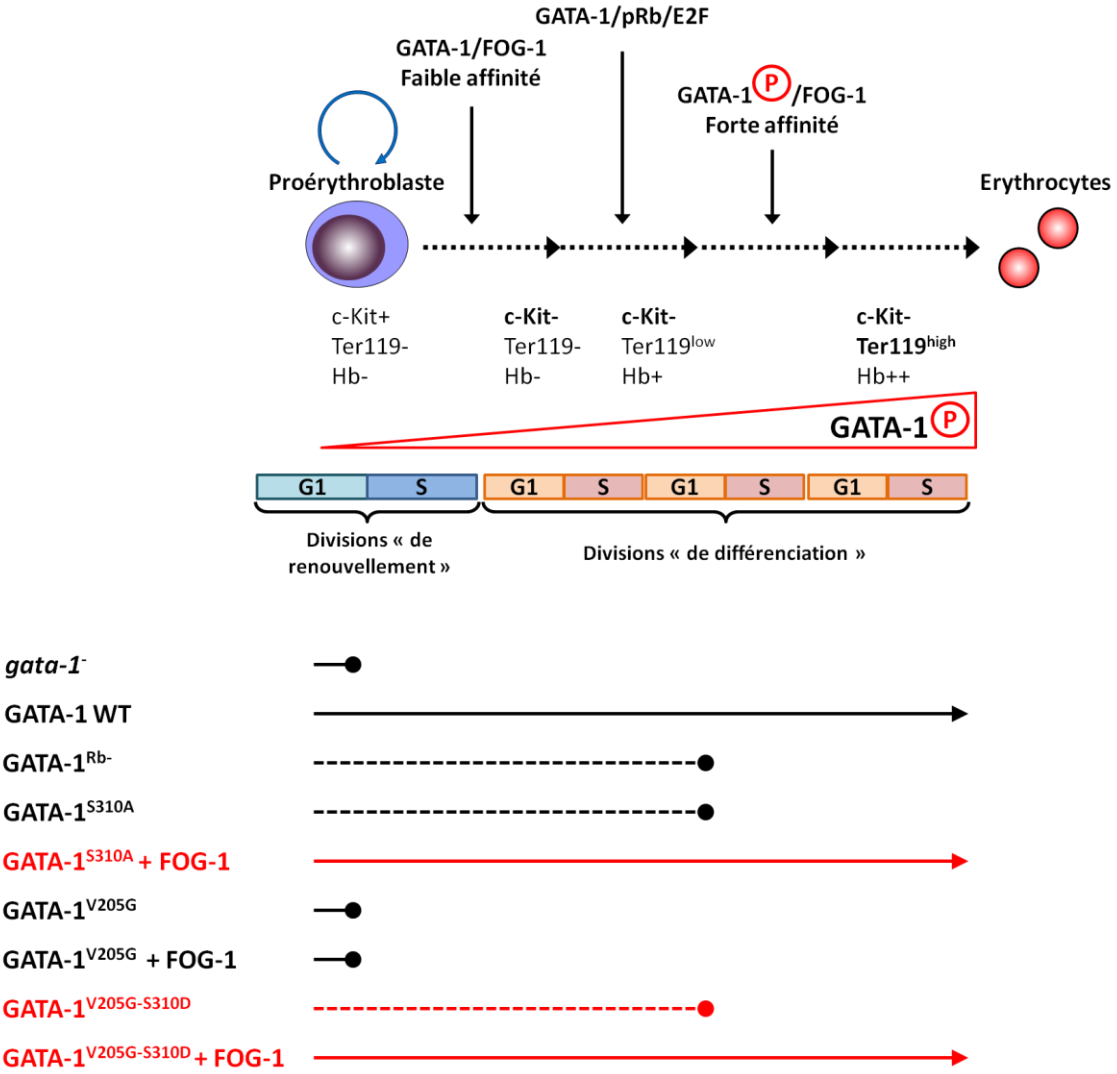


Illustration 34 : <u>Impact de la phosphorylation de GATA-1 sur la différenciation érythroïde terminale</u>
Les points d'impact des différents complexes GATA-1/FOG-1 ou GATA-1/pRb au cours de la différenciation terminale sont indiqués. Les flèches et lignes pointillées représentent l'état d'avancement de la différenciation érythroïde atteint par chaque protéine mutante exprimée dans la lignée G1E.

Le contrôle de la prolifération est assuré par le complexe GATA-1/pRb qui permet l'arrêt des divisions « de renouvellement » et l'établissement des divisions « de différenciation » nécessaires à la différenciation érythroïde terminale. Le programme de différenciation est contrôlé par le complexe GATA-1/FOG-1 : un complexe de faible affinité est suffisant pour l'initiation de ce programme et permet le passage de c-Kit+ à c-Kit-. Par contre, les dernières étapes de différenciation nécessitent la formation d'un complexe GATA-1/FOG-1 de forte affinité : c'est là que la phosphorylation de GATA-1 par Akt intervient en augmentant son affinité pour FOG-1.

Ce modèle s'appuie sur les données de la littérature et les résultats que nous avons obtenus avec l'expression des différentes formes mutées de GATA-1 dans la lignée G1E.

En effet, lorsque l'interaction GATA-1/FOG-1 est abrogée (GATA-1-V205G), les cellules conservent un phénotype c-Kit+/Ter119-, elles restent bloquées au stade proérythroblaste (Crispino et al., 1999 ; résultats). Par contre, les cellules G1E exprimant la protéine GATA-1-V205G perdent leur capacité de prolifération (Kadri et al., 2009). Cela s'explique par le fait que l'interaction de GATA-1-V205G avec pRb est conservée, et permet le contrôle de la prolifération.

Lorsque l'interaction GATA-1/pRb est abrogée (GATA-1-Rb^-), les cellules entrent en différenciation (c-Kit-/$Ter119^{low}$) : le programme de différenciation est initié grâce à l'interaction GATA-1-Rb^-/FOG-1. Cependant, les cellules ne perdent pas leur capacité de prolifération. Le changement de divisions n'a pas lieu et la différenciation érythroïde est alors incomplète (Kadri et al., 2009).

Lorsque GATA-1 n'est pas phosphorylé (GATA-1-S310A), les cellules entrent en différenciation et perdent leur capacité de prolifération : l'interaction GATA-1-S310A/pRb assure le contrôle de la prolifération nécessaire et le programme de différenciation est initié grâce à l'interaction GATA-1-S310A/FOG-1 de faible affinité. Par contre, cette interaction de faible affinité n'est pas suffisante pour assurer une différenciation complète (Kadri et al., 2005 ; résultats).

Dans un contexte où l'interaction GATA-1/FOG-1 est abrogée, la phosphorylation constitutive de GATA-1-V205G (GATA-1-V205G-S310D) conduit à un phénotype équivalent à celui observé avec la protéine GATA-1-S310A : l'interaction GATA-1-V205G-S310D/pRb assure le contrôle de la prolifération, et la mutation S310D restaure une faible affinité avec FOG-1, induisant ainsi l'initiation du programme de différenciation érythroïde. De la même manière qu'avec GATA-1-S310A, cette faible affinité n'est pas suffisante pour assurer une différenciation complète. Dans ce contexte, la surexpression de FOG-1 permet l'induction par GATA-1-V205G-S310D et GATA-1-S310A d'une différenciation érythroïde équivalente à celle induite par la protéine sauvage. La surexpression de FOG-1 permet de restaurer une forte affinité entre chacune de ces deux protéines et FOG-1, et d'assurer la réalisation des dernières étapes de la différenciation.

Ainsi, une forte affinité entre GATA-1 et FOG-1 est nécessaire aux dernières étapes de la différenciation. Dans un contexte sauvage, cette forte affinité est obtenue grâce à la phosphorylation de GATA-1 par Akt sur la Ser310. Un élément supplémentaire en faveur de ce modèle est l'augmentation de la phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 que nous avons observée dans les cellules érythroïdes matures de foie fœtal murin (c-Kit-/Ter119+) par rapport aux stades précoces (c-Kit+/Ter119-) (données non montrées).

Dans ce travail, nous avons montré que la phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 permet de surmonter le blocage de différenciation érythroïde induit par l'expression de la protéine GATA-1-V205G *in vitro*. A l'inverse, quelle est l'implication de la phosphorylation de GATA-1 dans le cas d'un excès de production érythroïde, comme c'est le cas dans la polyglobulie de Vaquez ? La polyglobulie de Vaquez (Polycythemia Vera – PV) se caractérise par une production aberrante d'érythrocytes. Celle-ci est causée par une suractivation de la protéine JAK2, due à la mutation JAK-V617F. la phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 est dépendante de la voie Epo/JAK2/PI3K/Akt. Il a été montré que GATA-1 est surexprimé dans les cellules de patients PV. De plus, un inhibiteur de JAK2, qui diminue la formation de colonies par les progéniteurs JAK2-V617F, réduit la transcription et la phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 (Geron et al., 2008). D'après ces résultats et le modèle que nous proposons, nous pouvons supposer que la phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310 joue un rôle dans la production aberrante d'érythrocytes observée dans la polyglobulie. Dans ce cas, l'inhibition de la phosphorylation de GATA-1 permettrait de contrebalancer l'effet de la mutation JAK2-V617F sur la production érythrocytaire. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait exprimer une protéine GATA-1 non phosphorylable (GATA-1-S310A) dans les cellules de patients PV et évaluer leur potentiel clonogénique. A plus long terme, il pourrait être intéressant d'introduire la mutation *gata-1-S310A* dans une lignée murine transgénique exprimant la protéine JAK2-V617F, établie par Shide et coll. (Shide et al., 2008), et d'évaluer l'effet produit sur le phénotype d'érythrocytose de ces souris.

2. L'IGF-1 compense les défauts érythroïdes dus à l'absence de phosphorylation de GATA-1

Dans les deux premières parties des résultats, nous avons montré que la phosphorylation de GATA-1 par Akt joue un rôle dans les dernières étapes de la différenciation érythroïde terminale *in vitro*. Cependant, il existe un modèle de souris Knock-In exprimant la protéine GATA-1-S310A non phosphorylable par Akt, créé par l'équipe de S.H. Orkin, qui est viable et ne présente pas de défaut érythropoïétique évident (Rooke and Orkin, 2006). Compte tenu de nos résultats, nous avons posé l'hypothèse qu'il existait un ou plusieurs mécanismes de compensation permettant de masquer d'éventuels défauts dus à la mutation gata-1-S310A. Nous avons alors étudié l'érythropoïèse de ces souris à un stade plus précoce (E11.5) et dans des conditions de culture plus drastiques pour rechercher ces mécanismes. Ainsi, nous avons mis en évidence plusieurs éléments spécifiques de l'érythropoïèse des souris gata-1-S310A (**Illustration 35**).

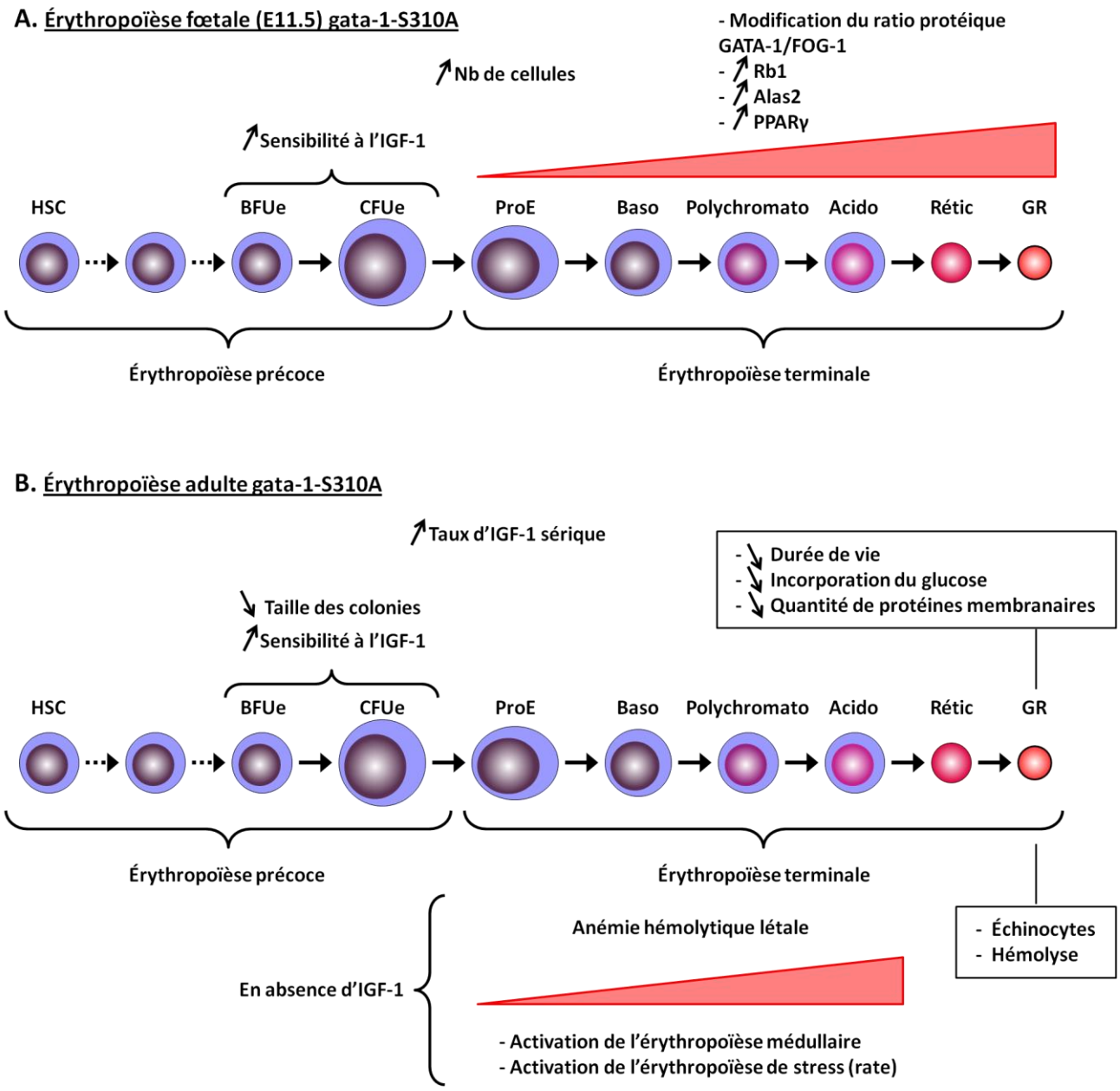


Illustration 35 : L'érythropoïèse des souris gata-1-S310A est différente de celle des souris sauvages
HSC : Hematopoietic Stem Cell ; **BFUe** : Burst-Forming Unit erythroid ; **CFUe** : Colony-orming Unit erythroid ; **ProE** : proérythroblaste ; **Baso** : érythroblaste basophile ; **Polychromato** : érythroblaste polychromatophile ; **Acido** : érythroblaste acidophile ; **Rétic** : réticulocyte ; **GR** : globule rouge.

Au niveau fœtal (**Illustration 35A**), au stade où l'érythropoïèse définitive s'installe (E11.5), nous avons observé une augmentation globale de la cellularité dans les foies fœtaux gata-1-S310A. Nous avons également observé une accélération de l'érythropoïèse : le ratio cellules matures / cellules immatures est supérieur chez les souris gata-1-S310A. De plus, les progéniteurs érythroïdes gata-1-S310A présentent une dépendance accrue à l'insuline/IGF-1 et à la transferrine. D'autre part, des résultats préliminaires montrent, dans les foies fœtaux gata-1-S310A, une modification du ratio des protéines GATA-1 et FOG-1 ainsi qu'une augmentation de l'expression de certains gènes comme Rb1, Alas2 et PPARγ.

Chez l'adulte, en conditions physiologiques (**Illustration 35B**), nous avons montré que la durée de vie des globules rouges gata-1-S310A est deux fois plus courte que celle des contrôles. Les globules rouges gata-1-S310A présentent également une diminution de la quantité de protéines membranaires ainsi qu'une diminution de l'incorporation du glucose. Comme dans le foie fœtal, les progéniteurs médullaires ont une dépendance accrue à l'insuline/IGF-1 et à la transferrine. De plus, le taux d'IGF-1 sérique des souris gata-1-S310A est supérieur à celui des contrôles. Ces deux derniers éléments suggéraient un rôle de l'IGF-1 dans l'érythropoïèse de ces souris. Nous avons alors choisi d'étudier l'érythropoïèse de ces souris en inhibant la voie IGF-1. L'inhibition de cette voie (par un inhibiteur du récepteur à l'IGF-1 – PPP) a révélé des défauts érythroïdes majeurs chez les souris gata-1-S310A. En absence de signalisation IGF-1 (**Illustration 35B**), l'absence de phosphorylation sur la Ser310 de GATA-1 conduit à des défauts de l'intégrité membranaire des érythrocytes avec l'apparition d'échinocytes, induisant une anémie hémolytique létale chez ces souris. Ainsi nous avons montré l'existence d'au moins un mécanisme de compensation mis en place chez les souris gata-1-S310A pour pallier à l'absence de phosphorylation de GATA-1 : l'activation de la signalisation IGF-1.

A l'issue de ce travail, nous pouvons nous interroger sur différents points. Nous avons mis en évidence un mécanisme de compensation permettant de pallier à une déficience fonctionnelle de GATA-1 *in vivo*. Quels sont les mécanismes connus permettant de compenser une déficience fonctionnelle chez la souris ? Ce mécanisme met en jeu la voie IGF-1. Pourquoi un défaut érythroïde conduit à l'activation de la signalisation IGF-1 ? Par quels mécanismes moléculaires et cellulaires l'IGF-1 compense-t-il l'absence de phosphorylation de GATA-1 ?

2.1. Mécanismes de compensation chez la souris

Chez la souris, quels types de mécanismes permettent de compenser un défaut fonctionnel ?

Si l'on prend l'exemple de la protéine GATA-1, il existe plusieurs modèles murins dans lesquels une déficience de GATA-1, conduisant à des défauts érythroïdes, peut être compensée. La déficience de l'interaction GATA-1/FOG-1 entraîne chez la souris une létalité embryonnaire. En effet, des souris Knock-In exprimant la protéine GATA-1-V205G meurent *in utero* d'une sévère anémie (Chang et al., 2002). Pourtant, Shimizu et coll. ont créé un modèle de souris transgéniques où la surexpression de GATA-1-V205G supprime la létalité des souris GATA-1.05 (Shimizu et al., 2004). Les souris transgéniques GATA-1-V205G sont viables et ne présentent pas de défauts érythropoïétiques majeurs. Ainsi, la déficience d'interaction entre GATA-1-V205G et FOG-1 peut être compensée *in vivo* par la surexpression de GATA-1-V205G. Si elle ne compense pas entièrement les défauts induits dans

le lignage mégacaryocytaire, la surexpression de GATA-1-V205G permet en revanche une érythropoïèse normale. L'invalidation de GATA-1 peut également être compensée par l'expression de facteurs de transcription homologues. En effet, la létalité des souris GATA-1.05 est supprimée par l'expression de GATA-2 ou GATA-3 sous contrôle du promoteur de GATA-1 (G1HRD) (Takahashi et al., 2000). L'expression de GATA-2 ou GATA-3 permet de restaurer totalement l'érythropoïèse fœtale et périnatale, assurant ainsi la survie des individus jusqu'à l'âge adulte. Dans ces deux cas, la déficience de GATA-1 est compensée artificiellement par manipulation génétique.

Toutefois, il n'est pas rare d'observer également *in vivo* la mise en place d'une compensation « naturelle » assurée par l'organisme pour pallier à une déficience fonctionnelle. En effet, les processus physiologiques et cellulaires sont régulés par des mécanismes complexes impliquant de nombreux facteurs. Ces facteurs sont souvent redondants de sorte que la déficience ou la perte de fonction de l'un d'entre eux peut être compensée par l'activation d'un autre. On peut citer en exemple l'invalidation d'Akt1 qui n'entraîne pas de létalité chez la souris malgré son expression ubiquitaire et son rôle majeur dans la survie et la prolifération cellulaire (Chen et al., 2001). L'absence d'Akt1 est vraisemblablement compensée par ses deux isoformes Akt2 et Akt3. Une déficience fonctionnelle peut aussi conduire à l'activation d'un processus physiologique. Par exemple, l'invalidation génique de la myoglobine chez la souris est compensée pas différentes modifications physiologiques. La myoglobine est une protéine nécessaire au transport de l'oxygène dans les muscles squelettiques et en particulier le muscle cardiaque. Elle est donc importante pour le maintien de la fonction cardiaque. Pourtant, les souris *Myo*$^{-/-}$ sont viables, fertiles et ne présentent aucun signe évident de défauts fonctionnels (Gödecke et al., 1999). Les auteurs ont alors mis en évidence plusieurs mécanismes de compensation : une augmentation de la densité des capillaires, une augmentation du flux coronarien, et une augmentation de l'hématocrite. Tous ces mécanismes visent d'une part à augmenter le gradient d'oxygène et d'autre part à réduire la distance entre les capillaires et les mitochondries des cellules cardiaques. Ils permettent ainsi d'augmenter le flux d'oxygène de manière à maintenir une fonction cardiaque normale malgré l'absence de myoglobine.

Ce type de réponses physiologiques permettant de pallier à un défaut fonctionnel est également retrouvé dans le système érythropoïétique. L'invalidation conditionnelle partielle de GATA-1 dans les cellules hématopoïétiques chez des souris adultes n'entraîne pas d'anémie (Gutiérrez et al., 2008). Par contre, on peut observer une augmentation du nombre de réticulocytes. L'érythropoïèse est donc affectée par l'invalidation de GATA-1, mais les cellules érythroïdes qui n'ont pas été invalidées pour GATA-1 compensent le déficit des autres et permettent le maintien du taux de globules rouges à un niveau normal grâce à l'augmentation de la production érythropoïétique. Un autre exemple est la compensation de la déficience du récepteur à l'Epo. Des souris transgéniques exprimant un récepteur à l'Epo tronqué dépourvu de ses 8 phosphotyrosines (Epo-R-HM) sont viables et ne

présentent qu'une légère anémie (Zang et al., 2001). Li et coll. ont montré que l'activité de ce récepteur est atténuée : elle est inférieure à celle du récepteur sauvage en réponse à de faibles doses d'Epo correspondant aux doses physiologiques (Li et al., 2003). Ils montrent également que cette diminution d'activité est compensée *in vivo* par une augmentation de l'activité des facteurs de croissance présents dans le sérum. Ainsi, chez la souris, la déficience d'une voie de signalisation peut être compensée par la suractivation d'autres voies pour assurer une érythropoïèse efficace.

Dans notre étude, la déficience d'une modification post-traductionnelle Epo-dépendante de GATA-1 est compensée par l'activation de la signalisation IGF-1.

2.2. Un défaut érythroïde compensé par l'IGF-1

Habituellement, la réponse physiologique à une anémie est l'augmentation de la production et du taux d'Epo sérique induite par l'hypoxie tissulaire. Pourtant, nous n'observons pas d'augmentation du taux sérique d'Epo chez les souris gata-1-S310A. Le rôle de l'Epo est de stimuler la production d'érythrocytes. Ainsi, une augmentation du taux d'Epo ou une suractivation des voies de signalisation Epo-dépendantes conduisent à une production aberrante de globules rouges (polyglobulie). En absence de compensation par l'IGF-1, les souris gata-1-S310A développent une anémie hémolytique. Cependant, cette anémie est régénérative, indiquant que la production d'érythrocytes n'est pas déficiente. Le défaut réside dans la qualité des érythrocytes produits. Nous pouvons alors supposer qu'une augmentation du taux d'Epo ne ferait qu'augmenter la production d'érythrocytes déficients, sans améliorer leur qualité.

D'autre part, l'Epo n'est pas le seul facteur ayant un effet positif sur l'érythropoïèse. Les glucocorticoïdes (Golde et al., 1976) et les œstrogènes (Singer and Adamson, 1976) font partie des premiers facteurs utilisés pour stimuler l'érythropoïèse *in vitro*. Récemment, Coulon et coll. ont identifié l'IgA1 polymérique (pIgA1) comme un nouveau facteur stimulant l'érythropoïèse (Coulon et al., 2011). Les auteurs montrent que la pIgA1 améliore la réponse à une dose sous-optimale d'Epo. Elle régule positivement l'érythropoïèse en agissant avec l'holotransferrine via le récepteur à la transferrine. Concernant l'IGF-1, son implication dans l'érythropoïèse est déjà connue depuis de nombreuses années. *In vitro*, l'IGF-1 est utilisé pour la culture des progéniteurs érythroïdes et est capable, à de fortes concentrations, de remplacer l'Epo pour la formation de BFU-e (Correa and Axelrad, 1991). Il a été montré que l'IGF-1 agit en synergie avec l'Epo pour promouvoir la maturation au cours des derniers stades de l'érythropoïèse, en augmentant la synthèse de l'hème et en induisant la condensation nucléaire et l'énucléation (Muta et al., 1994). De plus, il est également utilisé pour la production d'érythrocytes humains *ex vivo* à visée thérapeutique (pour revue : Migliaccio et al.,

2012). L'équipe de Douay notamment a mis au point des protocoles utilisant l'IGF-1 et permettant l'obtention d'érythrocytes matures *in vitro* (90-100% d'énucléation, des caractéristiques morphologiques classiques, une expression enzymatique normale et une déformabilité membranaire normale) (Douay and Andreu, 2007). *In vivo*, les progéniteurs érythroïdes de patients atteints de Polyglobulie de Vaquez présentent une hypersensibilité à l'IGF-1 (Correa et al., 1994) et une hyperactivation du récepteur à l'IGF-1 (Mirza et al., 1995). Récemment, un taux faible d'IGF-1 plasmatique a été associé à des anémies (Succurro et al., 2011).

Par ailleurs, l'implication de l'IGF-1 chez les souris gata-1-S310A est cohérente avec nos observations. En effet, nous avons observé un défaut d'incorporation du glucose par les globules rouges, ainsi qu'une augmentation de l'expression de PPARγ, impliqué dans le transport du glucose, dans les foies fœtaux des souris gata-1-S310A. Il n'est donc pas surprenant d'observer l'implication d'un facteur de croissance régulant le métabolisme cellulaire tel que l'IGF-1. De plus, l'IGF-1 a été directement impliqué dans le transport du glucose (Dimitriadis et al., 2008). Nous pouvons alors imaginer que le défaut d'incorporation du glucose soit l'élément déclencheur d'une réponse physiologique impliquant l'IGF-1.

L'implication inhabituelle d'un facteur dans un processus cellulaire a déjà été observée dans d'autres tissus. On peut citer en exemple le rôle de l'Epo mis en évidence dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Teng et al., 2011). Des souris exprimant l'Epo-R uniquement dans le tissu hématopoïétique deviennent obèses et développent une résistance à l'insuline. Elles présentent une diminution de la consommation d'énergie ainsi qu'une augmentation de la masse graisseuse et du nombre d'adipocytes. Ainsi, le couple Epo/Epo-R, principal régulateur de l'érythropoïèse, joue également un rôle majeur dans la régulation du métabolisme énergétique en contrôlant la consommation d'énergie et l'accumulation de masse graisseuse chez la souris.

2.3. Mécanismes moléculaires et cellulaires proposés

Pour compenser l'absence de phosphorylation de GATA-1 sur la Ser310, l'IGF-1 peut agir soit directement sur l'un des acteurs de l'équilibre moléculaire et les fonctions associées (contrôle de la prolifération via GATA-1/pRb/E2F et régulation transcriptionnelle via GATA-1/FOG-1), soit par un autre mécanisme, extérieur à cet équilibre, dont l'activation permettrait de pallier au déficit fonctionnel de GATA-1. En nous basant sur les données de la littérature et les résultats que nous avons obtenus, nous pouvons proposer trois hypothèses quant au mécanisme d'action de l'IGF-1 sur l'érythropoïèse des souris gata-1-S310A. Ces trois hypothèses sont résumées dans l'**illustration 36**.

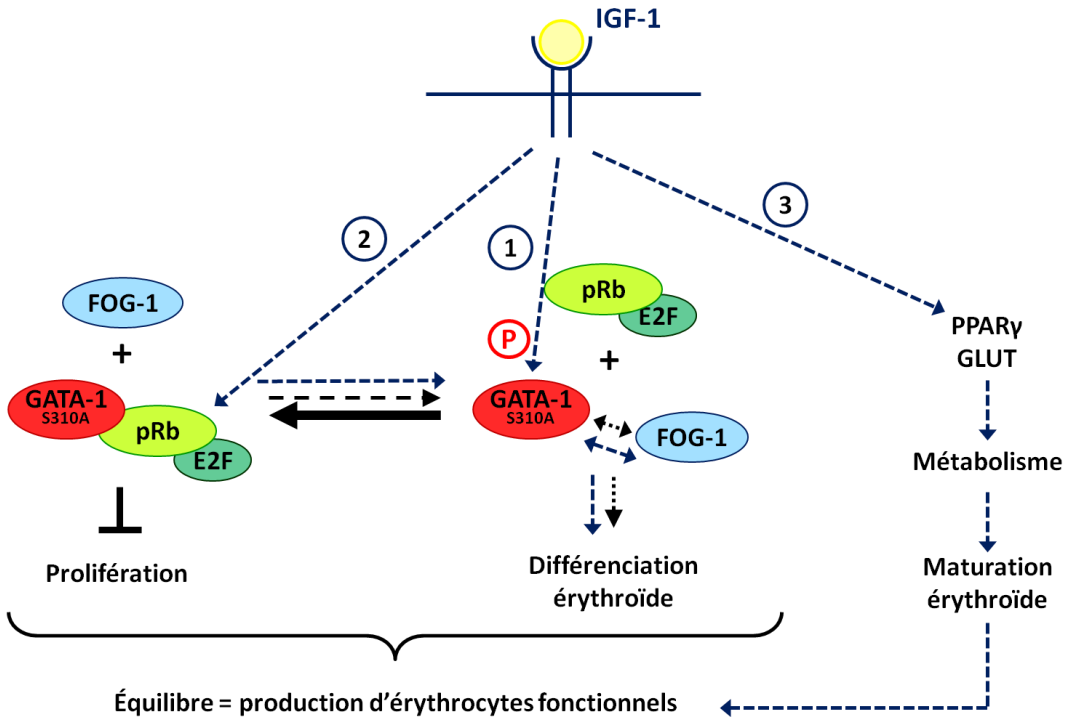


Illustration 36 : <u>Hypothèses de mécanismes d'action de l'IGF-1 pour compenser l'absence de phosphorylation de GATA-1</u>
1) L'IGF-1 agirait sur l'état de phosphorylation global de GATA-1-S310A. 2) L'IGF-1 agirait sur le contrôle de la prolifération par le complexe GATA-1-S310A/pRb/E2F. 3) L'IGF-1 agirait sur le métabolisme des progéniteurs érythroïdes.

1) GATA-1 possède 6 autres sites de phosphorylation (Crossley and Orkin, 1994). Parmi ceux-ci, la phosphorylation sur la Ser26 par la kinase ERK joue un rôle important dans l'expression des gènes de survie *Bcl-X*$_L$ et *E4bp4* dans les cellules Ba/F3 (Yu et al., 2005). De plus, les progéniteurs médullaires de souris exprimant une protéine GATA-1 mutée sur trois sites de phosphorylation (Ser71, Ser142 et Ser310) produisent moins de colonies que les progéniteurs gata-1-S310A et contrôles en conditions optimales de culture (Rooke and Orkin, 2006). Cela suggère un effet cumulatif de la perte progressive de la phosphorylation de GATA-1. Dans ce cas, la perte d'une phosphorylation serait compensée par la phosphorylation des autres sites. On peut alors imaginer que la signalisation IGF-1 permette une phosphorylation accrue des autres sites de GATA-1 notamment via les MAPK qui ciblent les Ser26 et 178. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait tout d'abord évaluer l'état de phosphorylation de tous les sites de GATA-1 dans les progéniteurs érythroïdes avant et après traitement au PPP. Puis, l'expression d'une protéine GATA-1 mutée sur tous les sites de phosphorylation dans un modèle de souris Knock-In permettrait de déterminer s'il existe ou non un effet cumulatif de la perte progressive de la phosphorylation.

2) L'IGF-1 pourrait également agir sur le contrôle de la prolifération cellulaire par GATA-1-S310A/pRb/E2F. Dans un contexte gata-1-S310A, l'affinité de GATA-1-S310A pour FOG-1 est réduite, la quantité de complexes GATA-1-S310A/pRb/E2F doit donc être importante. Dans ce cas, le blocage de la prolifération est également plus important que dans un contexte normal. L'IGF-1 est un facteur

de croissance qui stimule la prolifération cellulaire. Dans les progéniteurs mégacaryocytaires fœtaux, Klusmann et coll. ont montré que la voie mitogénique IGF-1/PI3K/Akt/mTOR stimule la prolifération cellulaire en activant les cibles des facteurs de transcription E2F et que GATA-1 restreint cette stimulation en interagissant avec E2F. Dans les progéniteurs DS-AMKL, l'expression de la forme courte GATA-1s incapable d'interagir avec pRb/E2F, ainsi que la suractivation de la voie IGF-1 (peut-être due au contexte de trisomie 21), conduisent à la prolifération aberrante des progéniteurs et au phénotype leucémique observé (Klusmann et al., 2010). On peut alors imaginer que, dans un contexte gata-1-S310A où la prolifération est bloquée par un excès de complexes GATA-1-S310A/pRb/E2F, l'activation de la voie IGF-1 permette de contrer cet effet en activant les facteurs de transcription E2F. Toutefois, nous pouvons d'ores et déjà exclure l'implication de la voie PI3K/Akt/mTOR puisque la rapamycine (inhibiteur de mTOR) n'a pas d'effet sur l'érythropoïèse des souris gata-1-S310A (données non montrées). On peut également supposer que l'IGF-1 stimule la progression du cycle cellulaire directement par la dissociation du complexe GATA-1-S310A/pRb/E2F. GATA-1-S310A et E2F interagissent avec la forme hypophosphorylée de pRb. La signalisation IGF-1 pourrait conduire à la phosphorylation de pRb, et permettre ainsi la libération d'E2F et la reprise du cycle cellulaire. Une étude récente montre que la cycline D3 joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire au cours de l'érythropoïèse terminale. En effet, elle régule le nombre de divisions cellulaires, contrôlant ainsi la taille et le nombre d'érythrocytes produits (Sankaran et al., 2012b). On sait que la cycline D3, en combinaison avec cdk4, phosphoryle pRb pour permettre la progression du cycle cellulaire (Kato et al., 1993). Il est possible que, dans les progéniteurs érythroïdes gata-1-S310A, la voie IGF-1 phosphoryle pRb via la cycline D3. Plusieurs travaux ont d'ailleurs mis en évidence l'augmentation de l'expression des cyclines D en réponse à l'IGF-1 dans différents tissus. Dans les précurseurs embryonnaires du cortex cérébral, l'IGF-1 induit l'augmentation de la quantité de cycline D1 et D3 via la voie PI3K/Akt (Mairet-Coello et al., 2009). Dans les cellules épithéliales, les cyclines D1, D2 et D3 sont augmentées en réponse à la signalisation IGF-1/MAPK (Li et al., 2007). Par ailleurs, la phosphorylation de pRb en réponse à l'IGF-1 permettrait également la libération de GATA-1-S310A, augmentant ainsi la probabilité de former des complexes avec FOG-1.

3) L'action de l'IGF-1 sur l'érythropoïèse des souris gata-1-S310A peut aussi être extérieure à l'équilibre moléculaire impliquant GATA-1, FOG-1 et pRb. Nous avons montré que les globules rouges des souris gata-1-S310A présentaient une déficience de l'incorporation du glucose et une diminution de l'expression de GLUT-4 à la membrane. De plus, en absence de signalisation IGF-1, les globules rouges gata-1-S310A présentent une morphologie altérée (échinocyte) retrouvée chez des patients porteurs d'une mutation du transporteur de glucose GLUT-1 (Weber et al., 2008). L'absence de phosphorylation de GATA-1-S310A semble altérer le transport du glucose. Plusieurs études ont

montré que l'IGF-1 facilite le transport du glucose en augmentant l'activité du transporteur (Olianas et al., 2011), ou son recrutement à la membrane (Dimitriadis et al., 2008). Nous pouvons alors supposer que la suractivation de la signalisation IGF-1 permette d'améliorer l'incorporation du glucose par les progéniteurs érythroïdes. Un élément supplémentaire en faveur de cette hypothèse est l'augmentation de l'expression de PPARγ que nous avons observé dans les foies fœtaux gata-1-S310A. En effet, PPARγ a été impliqué dans le métabolisme du glucose. Des agonistes de PPARγ (Thiazolidinediones) sont utilisés comme traitement antidiabétique car ils augmentent la sensibilité des cellules à l'insuline (pour revue : Mudaliar and Henry, 2001). Et plusieurs études ont montré l'implication de PPARγ dans la stimulation de l'incorporation du glucose (Picard and Auwerx, 2002; Liao et al., 2007). Bien qu'une activation de PPARγ par l'IGF-1 ne soit pas encore connue, plusieurs connexions entre PPARγ et la signalisation IGF-1 ont été montrées (pour revue : Belfiore et al., 2009). Nous pouvons alors faire l'hypothèse que l'activation de la voie IGF-1 faciliterait l'incorporation du glucose dans les progéniteurs érythroïdes via l'augmentation de PPARγ. La mesure de l'incorporation du glucose par les progéniteurs érythroïdes avant et après traitement au PPP permettrait de déterminer si l'IGF-1 influe sur ce phénomène. D'autre part, l'utilisation d'antagonistes de PPARγ apporterait des éléments pour définir le rôle de PPARγ dans l'érythropoïèse des souris gata-1-S310A.

Une autre hypothèse serait que l'IGF-1 compense l'absence de phosphorylation de GATA-1 via un autre facteur de transcription érythroïde. L'Erythroid Krüppel-Like Factor (EKLF ou KLF1) serait alors un bon candidat. En effet, EKLF est un facteur de transcription essentiel à l'érythropoïèse. Son invalidation entraîne une anémie létale embryonnaire chez la souris (Nuez et al., 1995). De plus, comme GATA-1, il contrôle la plupart des processus régulant la différenciation érythroïde terminale (pour revue : Tallack and Perkins, 2010). Il régule en effet de nombreux gènes érythroïdes qui sont également des cibles de GATA-1 comme les gènes de globines, les gènes des enzymes de la biosynthèse de l'hème (Alas2, PBGD), des gènes de transporteurs mitochondriaux (ABC-me), des gènes anti-apoptotiques (Bcl-X). Surtout, il a été impliqué dans le maintien de l'intégrité membranaire et la régulation des gènes codant pour les protéines de la membrane du globule rouge (Drissen et al., 2005; Nilson et al., 2006) qui semblent les premiers affectés par l'absence de phosphorylation de GATA-1 dans notre modèle murin en absence de compensation par l'IGF-1. Ces éléments en font donc un bon candidat pour la compensation d'une déficience transcriptionnelle de GATA-1. De plus, au cours de l'érythropoïèse terminale, EKLF contrôle également la progression du cycle cellulaire via les facteurs E2F. En effet, le défaut de différenciation érythroïde terminale observé chez les souris EKLF$^{-/-}$ est associé à une perturbation du cycle cellulaire et une diminution de l'expression d'E2F2 (Pilon et al., 2008). Et une autre étude a montré que EKLF contrôle l'entrée en phase S des progéniteurs érythroïdes par la régulation directe de l'expression d'E2F2 (Tallack et al.,

2009). Ainsi, dans un contexte gata-1-S310A où l'excès de complexes GATA-1-S310A/pRb/E2F bloquerait la progression du cycle, l'activation d'EKLF pourrait également stimuler la progression du cycle via la régulation d'E2F2.

A ce jour, aucun lien direct n'a été mis en évidence entre l'IGF-1 et le facteur EKLF. Cependant, il a été montré que l'IGF-1 stimule l'expression d'un autre membre de la famille des KLF, le facteur de transcription KLF6, dans la lignée cancéreuse colorectale humaine HCT116 (Bentov et al., 2008). Par ailleurs, il est possible d'établir un lien indirect entre l'IGF-1 et l'activation d'EKLF via la Caséine Kinase II. En effet, il a été montré, dans des lignées érythroïdes murines (MEL et 32DEpo1), que la phosphorylation du facteur EKLF par la Caséine Kinase II (CKII) augmente son activité transcriptionnelle (Ouyang et al., 1998). D'autre part, dans une lignée leucémique humaine, l'activation de la Caséine Kinase II nécessite la présence d'IGF-1 et de transferrine (Wang et al., 1995).

Nous pouvons alors poser l'hypothèse que, chez les souris gata-1-S310A, la suractivation de la voie IGF-1 (et la transferrine) permette l'activation du facteur de transcription EKLF via sa phosphorylation par la Caséine Kinase II. L'activation d'EKLF permettrait ainsi de pallier aux défauts transcriptionnels de GATA-1-S310A, notamment pour la transcription des gènes de membranes. Elle permettrait également de compenser l'excès de blocage du cycle cellulaire induit par GATA-1-S310A/pRb en activant l'expression d'E2F2. Le gène *Alas2* étant une cible d'EKLF, l'augmentation de son expression que nous avons observée dans les foies fœtaux des souris gata-1-S310A (résultats préliminaires) est un premier élément en faveur de cette hypothèse.

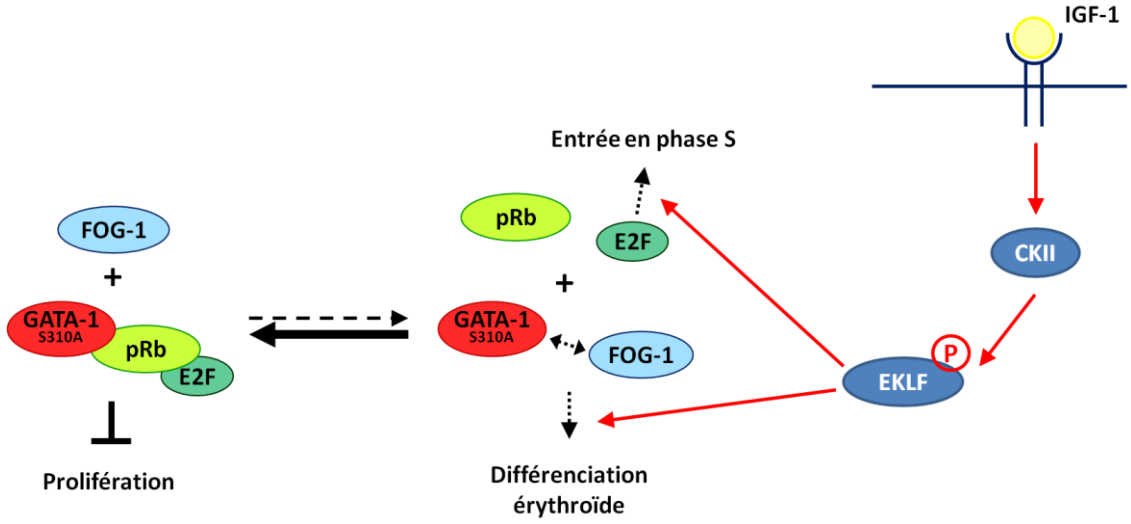


Illustration 37 : <u>Modèle hypothétique de compensation de l'absence de phosphorylation de GATA-1 par l'IGF-1 via le facteur de transcription érythroïde EKLF</u>
L'IGF-1 permettrait l'activation du facteur EKLF en induisant sa phosphorylation par la Caséine Kinase (**CKII**). Le facteur EKLF ainsi activé pourrait pallier aux défauts trancriptionnels de GATA-1-S310A en activant la trancription des gènes érythroïdes. Il permettrait également de compenser l'excès de blocage de la prolifération en activant la transcription du facteur E2F.

Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait évaluer l'activité de la Caséine Kinase II ainsi que l'expression et l'état de phosphorylation d'EKLF dans les progéniteurs érythroïdes gata-1-S310A et contrôle, avant et après traitement au PPP. Nous pourrions également effectuer des tests clonogéniques en présence d'IGF-1 et d'un inhibiteur de la CKII pour voir si la capacité clonogénique des progéniteurs érythroïdes est altérée.

MATERIEL ET METHODES

1. Culture cellulaire

1.1. Lignées cellulaires utilisées

La lignée cellulaire **NIH-3T3** est dérivée de fibroblastes embryonnaires de souris. Ce sont des cellules adhérentes dont la prolifération est rétro-contrôlée par inhibition de contact : elles arrêtent de proliférer à confluence. Ces cellules n'expriment ni GATA-1 ni FOG-1 et seront utilisées pour l'expression de protéines exogènes.

La lignée cellulaire **293-T** dérive de la lignée HEK-293, établie à partir de cellules embryonnaires de rein humain immortalisées (Human Embryonic Kidney). Ce sont des cellules adhérentes qui expriment l'antigène T du virus SV40, et ont un fort potentiel de transfectabilité. Elles seront utilisées pour l'expression de protéines exogènes.

La lignée **293-EBNA**, également dérivée des HEK-293, exprime l'Epstein-Barr virus Nuclear Antigen 1, permettant l'amplification de plasmides contenant l'origine de réplication virale de l'EBV. Ces cellules seront utilisées uniquement pour la production de surnageants rétroviraux.

La lignée cellulaire UT-7 provient de la moelle osseuse d'un patient atteint de leucémie mégacaryoblastique aiguë. Ces cellules nécessitent la présence de GM-CSF, d'IL3 ou d'Epo pour survivre (Komatsu et al., 1991). Ici, nous utilisons la lignée **UT-7/Epo**, dérivée de la lignée d'origine UT-7, strictement dépendante de l'Epo (Komatsu et al., 1993). Les cellules UT-7/Epo sont engagées dans le lignage érythroïde. Elles expriment fortement l'Epo-R à leur surface de manière endogène, ainsi que les protéines GATA-1 et FOG-1. Les cellules UT-7/Epo seront utilisées pour étudier la phosphorylation endogène de GATA-1.

La lignée **G1E** (GATA-1$^-$ Erythroid) dérive de cellules souches embryonnaires (cellules ES) murines invalidées pour le gène *gata-1* (Weiss et al., 1997). Ces cellules sont engagées dans le lignage érythroïde, mais l'absence de GATA-1 les empêche de poursuivre correctement leur maturation. Elles sont bloquées au stade proérythroblaste et sont de phénotype c-Kit+/Ter119-. L'expression de GATA-1 dans ces cellules permet de restaurer la différenciation érythroïde jusqu'au stade érythroblaste acidophile.

La lignée **G1E-ER** est un sous-clone de la lignée G1E exprimant stablement une protéine GATA-1 fusionnée au domaine de liaison (Ligand Binding Domain) du récepteur aux œstrogènes (Estrogen Receptor – ER) notée GATA-1-ER (Tsang et al., 1997; Gregory et al., 1999). Cette protéine est exprimée de manière constitutive mais reste inactive en absence d'œstrogènes. Les cellules G1E-ER sont donc également bloquées au stade proérythroblaste. La présence d'œstrogènes dans le milieu de culture permet l'activation de la protéine GATA-1-ER et la reprise de la maturation érythroïde.

Les cellules G1E et G1E-ER seront utilisées pour l'étude de la différenciation érythroïde *in vitro*.

1.2. Entretien des lignées cellulaires

Toutes les lignées sont maintenues à 37°C en atmosphère humide à 5% de CO_2.

Les cellules NIH-3T3, 293-T et 293-EBNA sont cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, PAA) complémenté par 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF, PAA), des antibiotiques (pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL, PAA) et de la L-Glutamine (2mM, PAA). Elles sont décollées par une solution de Trypsine-EDTA (PAA) et diluées deux fois par semaine, avant confluence.

Les cellules UT-7/Epo sont cultivées en milieu α-MEM (α-Modified Minimal Essential Medium, PAA) complémenté par 10% de SVF (PAA), des antibiotiques (pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL, PAA) et de la L-Glutamine (2mM, PAA), en présence de 2U/mL d'Epo recombinante humaine ($1x10^5$ U/mg, Roche Molecular Biochemicals). Elles sont diluées deux fois par semaine.

Les cellules G1E et G1E-ER sont cultivées en milieu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium – PAA) complémenté par 20% de SVF (PAA), des antibiotiques (pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL, PAA) et de la L-Glutamine (2mM, PAA), en présence de 2U/mL d'Epo recombinante humaine ($1x10^5$ U/mg, Roche Molecular Biochemicals), 8% de milieu conditionné contenant du SCF, et 6,2µL de monothioglycérol (MTG, Sigma).

La numération des cellules s'effectue dans une lame à numération (Kova slide, Hycor) par la technique d'exclusion au bleu Trypan. 20µL de bleu Trypan (0,16% bleu Trypan ; 150mM NaCl) sont ajoutés à 20µL de suspension cellulaire. Les cellules nécrotiques ou apoptotiques sont perméables et colorées en bleu.

1.3. Mise au repos / stimulation des cellules

1.3.1. UT-7/Epo

Les cellules sont diluées la veille afin d'être en phase exponentielle de croissance le jour de la déprivation. Lors de la mise au repos, les cellules sont centrifugées (1200 rpm, 10 min), lavées trois fois avec du PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PAA), puis resuspendues dans du milieu de déprivation (milieu IMDM, PAA ; BSA 1% ; L-Glutamine 2mM ; pénicilline 100U/mL ; streptomycine 100µg/mL ; holotransferrine humaine 10µg/mL) et incubées à 37°C pendant 16h.

Sauf indication contraire, les cellules sont stimulées par 10U/mL d'Epo pendant 10 min à 37°C. Du PBS froid, additionné d'inhibiteurs de Sérine/Thréonine phosphatases (β-glycérophosphate 25mM, pyrophosphate de sodium 1mM, NaF 20mM), est alors ajouté pour arrêter la réaction tout en maintenant le taux de phosphorylation des protéines.

1.3.2. NIH-3T3

Les cellules NIH-3T3 sont cultivées en milieu appauvri pendant 24h (DMEM + 0,5% SVF).

Elles sont ensuite stimulées par 50ng/mL de PDGF pendant 30 min à 37°C. Le milieu est retiré et du PBS froid, additionné d'inhibiteurs de Sérine/Thréonine phosphatases (β-glycérophosphate 25mM, pyrophosphate de sodium 1mM, NaF 20mM), est alors ajouté pour arrêter la réaction.

1.4. Induction de la différenciation érythroïde dans les G1E-ER

Les cellules G1E-ER sont diluées la veille afin d'être en phase exponentielle de croissance le jour de l'induction. Lors de l'induction, les cellules sont mises en culture à 10^5 cellules/mL, en présence de β-œstradiol (Sigma) à 10^{-7}M, jusqu'à 72h.

1.5. Mesure de la prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire est mesurée par un test fluorimétrique à l'UptiBlue (Uptima, Interchim). L'Uptiblue est un indicateur d'oxydoréduction qui traduit une activité métabolique par un changement de couleur et l'émission d'un signal fluorescent. L'intensité du signal est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Les cellules NIH-3T3 sont ensemencées la veille à 10^4 cellules/puits dans une plaque 24 puits noire. 50µL d'UptiBlue sont ajoutés au milieu. Après 3h d'incubation à 37°C, la fluorescence émise est mesurée à 590nm par excitation à 560nm (Mithras, Berthold).

1.6. Mesure de la différenciation érythroïde – coloration benzidine

La coloration benzidine permet d'estimer le nombre de cellules hémoglobinisées qui apparaissent en bleu par coloration de l'hémoglobine. L'hémoglobine produite par les cellules en cours de différenciation décompose l'eau oxygénée et libère de l'oxygène moléculaire qui oxyde la benzidine. La benzidine oxydée prend alors une coloration bleue visible au microscope optique. 10µL d'un mélange benzidine/H_2O_2 (solution de benzidine à 0,4% dans 12% d'acide acétique/10% H_2O_2 à 30% réalisée extemporanément) sont ajoutés à 100µL de suspension cellulaire. Après 2 min, les cellules colorées en bleu sont alors dénombrées dans une lame à numération (Kova Slide, Hycor). Le taux de différenciation est exprimé en pourcentage de cellules hémoglobinisées par rapport au nombre de cellules total.

1.7. Mesure de l'activité Luciférase

L'activité luciférase est mesurée à l'aide du kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega). Ce kit permet la mesure consécutive de l'activité luciférase d'intérêt (Firefly-Luciferase) et de l'activité luciférase interne (Renilla-Luciferase). Les mesures sont effectuées à l'aide d'un luminomètre (Mithras – Berthold) avec un temps de lecture de 20 secondes. L'activité F-Luciférase est mesurée par ajout de 20µL de lysat cellulaire à 70µL de tampon contenant le substrat de la F-Luciférase. L'activité R-Luciférase est ensuite mesurée par addition au mélange précédent de 70µL de tampon Stop&Glo contenant le second substrat.

2. Cytométrie

2.1. Marquage extracellulaire

Les cellules sont lavées avec du PBS/SVF-1% puis centrifugées (1200 rpm, 10 min). 10^5 cellules sont incubées 20 min à 4°C avec 100µL de solution d'anticorps (PBS/SVF-1%/Ac). Une fois marquées, les cellules sont à nouveau lavées avec du PBS/SVF-1%. Un marqueur de viabilité cellulaire (Sytox-Blue ou 7-AAD) est ajouté à la suspension. Les cellules sont conservées à 4°C à l'abri de la lumière avant lecture au cytomètre de flux.

Anticorps	Fluorochrome	Caractéristiques	Référence	Utilisation
c-Kit (CD117)	APC	IgG2b,κ de rat anti-CD117 murin	553356 – BD Pharmingen	1/500
Ter119	PE	IgG2b,κ de rat anti-Ter119 murin	553673 – BD Pharmingen	1/200
CD71	FITC	IgG1,κ de rat anti-CD71 murin	553266 – BD Pharmingen	1/1000
Isotype contrôle	APC	IgG2b,κ de rat	553991 – BD Pharmingen	1/500
Isotype contrôle	PE	IgG2b,κ de rat	553989 – BD Pharmingen	1/200
Isotype contrôle	FITC	IgG1,κ de rat	553924 – BD Pharmingen	1/1000

2.2. Analyse au cytomètre de flux

L'acquisition s'effectue sur le cytomètre de flux BD FACSCanto™ II à l'aide du logiciel BD FACSDiva™ software (BD Biosciences). Lors de l'analyse, les doublets sont éliminés en sélectionnant les singulets grâce aux paramètres FSC-H et FSC-A. Puis, les cellules négatives pour le marqueur de mortalité Sytox-Blue (ou 7-AAD) sont sélectionnées et analysées pour les marqueurs d'intérêt. La **Figure 66** montre un exemple d'analyse de cellules de foie fœtal avec les marqueurs CD71/Ter119.

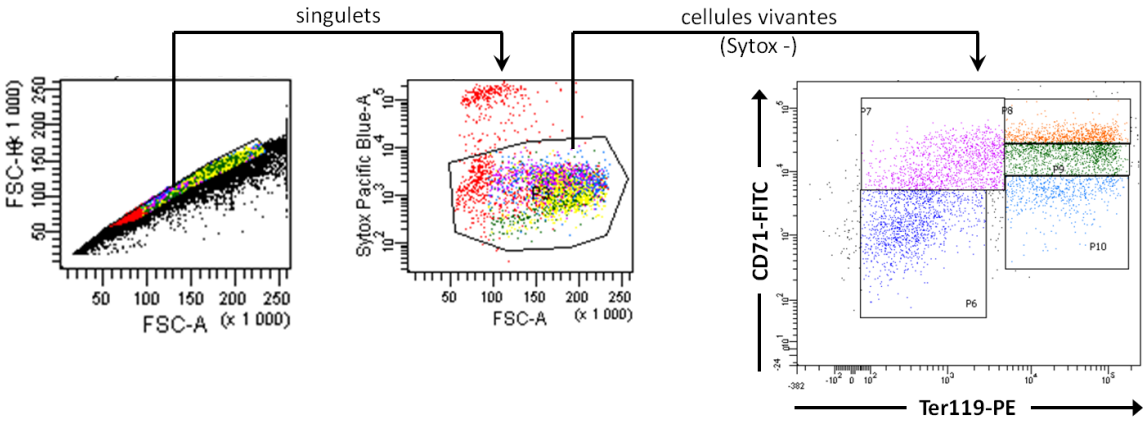


Figure 66 : Exemple d'analyse de cellules de foie fœtal au cytomètre de flux (FACSCanto™ II – BD Biosciences)

3. Expression de protéines exogènes

3.1. Plasmides utilisés

Plasmide	Protéine	GFP	Rétrovirus
MigR	-	+	+
MigR-gata-1-WT	**GATA-1-WT** : sauvage	+	+
MigR-gata-1-S310A	**GATA-1-S310A** : non phosphorylable	+	+
MigR-gata-1-S310D	**GATA-1-S310D** : mime une phosphorylation constitutive	+	+
MigR-gata-1-V205G	**GATA-1-V205G** : n'interagit pas avec FOG-1	+	+
MigR-gata-1-V205G-S310A	**GATA-1-V205G-S310A**	+	+
MigR-gata-1-V205G-S310D	**GATA-1-V205G-S310D**	+	+
RSV-Fog-1	**FOG-1**	-	-
RSV-Fog-1-S706R	**FOG-1-S706R** : interagit avec GATA-1-V205G	-	-
MigR-Fog-1	**FOG-1**	+	+

3.2. Transfection transitoire

La lipofectamine (Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent) (0,3 µL/cm² de surface de culture) est mélangée au milieu Opti-MEM (10 µL/cm²) et incubée 5 minutes à température ambiante (TA). Puis l'ADN (0,1 µg/cm²) est ajouté au mélange. Le tout est laissé 30 mn à TA. La solution « ADN/Lipofectamine/Opti-MEM » est alors ajoutée goutte à goutte aux cellules ensemencées la veille (50% de confluence) qui sont ensuite remises à incuber à 37°C. Les cellules sont lysées 48h après transfection.

3.3. Transduction rétrovirale

Les plasmides MigR (MSCV-IRES-GFP-Retrovirus) sont utilisés pour la production de vecteurs rétroviraux.

3.3.1. Production de surnageants rétroviraux

Les cellules 293-EBNA sont utilisées comme cellules « d'empaquetage » pour la production de vecteurs rétroviraux. Elles sont tout d'abord transfectées, selon le protocole décrit plus haut, avec les vecteurs suivants :

- Gag-pol : codant la protéine de capside virale Gag, et la reverse transcriptase Pol
- VSV-G : codant la protéine Vesicular Stomatitis Virus G d'enveloppe virale
- le vecteur d'intérêt (MigR) dont la séquence sera incorporée dans la particule virale.

Le milieu est changé 24h après la transfection. 48h et 72h après transfection, le surnageant contenant les particules virales est récolté, filtré sur membrane de 0,45µm pour éliminer les débris cellulaires, puis concentré par ultracentrifugation (22000 rpm, 1h30, 4°C). Le culot de particules virales est alors resuspendu dans du PBS, aliquoté et conservé à -80°C.

3.3.2. Transduction des NIH-3T3

Les NIH-3T3 sont ensemencées à 10^5 cellules/puits (plaque 6 puits) à J-1. A J0, le surnageant viral est ajouté au milieu de culture. 48 heures après transduction (J2), le pourcentage de cellules transduites (GFP-positives) est évalué par cytométrie de flux.

3.3.3. Transduction des G1E/G1E-ER

Les cellules sont ensemencées à J0 à 5.10^5 cellules/mL dans 200µL de milieu et mises en présence de surnageant viral pendant 4h à 37°C. Elles sont alors diluées à 2.10^5 cellules/mL. A J1, elles sont à nouveau diluées. Le pourcentage de transduction est évalué à J2 par cytométrie de flux (cellules GFP-positives).

4. Biochimie

4.1. Extraction protéique et dosage

4.1.1. Préparation d'extraits cellulaires

Les cellules en suspension sont centrifugées (1200 rpm, 10 min), puis lavées avec du PBS. Les cellules adhérentes sont décollées manuellement, reprises dans du PBS puis centrifugées. Le traitement est ensuite identique pour les deux types cellulaires.

Le culot cellulaire est resuspendu dans du tampon A (HEPES - 20mM ; $MgCl_2$ - 3mM ; KCl - 10mM ; Glycérol bidistillé - 5% ; NP40 - 0,5% ; inhibiteurs de protéases ; inhibiteurs de phosphatases (NaF - 20mM ; βglycérophosphate - 25mM ; Pyrophosphate de Sodium - 1mM)), incubé 5 min sur la glace, puis centrifugé (10 000 rpm, 2 min, 4°C). Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube : c'est la **fraction cytoplasmique**. Le culot est repris dans du tampon B (tampon A ; KCl – 300mM), incubé 30 min sur la glace en vortexant régulièrement. Après centrifugation (14 000 rpm, 30 min, 4°C), le surnageant est récupéré : c'est la **fraction nucléaire**. Le **culot insoluble** contient la chromatine et les protéines insolubles associées. Les trois extraits obtenus (fractions cytoplasmique, nucléaire et culot) sont conservés à -20°C.

4.1.2. Extraction des protéines membranaires des globules rouges

Les globules rouges sont lysés par choc osmotique dans une solution hypotonique. Après centrifugation (14000 rpm), le surnageant renferme le contenu cytoplasmique tandis que le culot contient les protéines membranaires.

4.1.3. Dosage protéique

La quantité de protéines dans les extraits est déterminée par dosage colorimétrique à l'acide bicinchoninique (BCA Protein Assay – Pierce). En milieu alcalin, les protéines réduisent les ions Cu^{2+} en ions Cu^{+}. Ces derniers forment avec l'acide bicinchoninique (BCA) un complexe coloré qui absorbe la lumière à 562 nm (violet). L'apparition de ce complexe est donc proportionnelle à la quantité de protéines présente dans l'extrait.

4.2. Immunoprécipitation

Les extraits nucléaires (500 µg de protéines) sont incubés avec 1 µg d'anticorps à 4°C, sous agitation, sur la nuit. Les billes de sépharose couplées à la protéine G sont pré-incubées avec 0,2% de BSA pendant 30 min pour saturer les sites aspécifiques, puis sont ajoutées au mix extraits+Ac et

incubées 30 min à 4°C sous agitation. Après centrifugation, le surnageant contenant tout ce qui ne s'est pas lié aux billes, est récupéré. Puis, les billes sont lavées quatre fois avec du tampon A (composition en § 4.1.1.) et les complexes « protéine G/Ac/protéine d'intérêt » sont récupérés. Les échantillons sont conservés à -20°C.

4.3. Western blot

Les échantillons (extraits cellulaires, produits d'IP) sont dénaturés par chauffage (95°C, 5 min) dans du tampon Laemmli (Tris/HCl pH6,8 – 62,5mM ; SDS – 2% ; glycérol – 10% ; DTT – 35mM ; bleu de bromophénol), puis déposés sur un gel SDS-PAGE. Des marqueurs de poids moléculaires (Prestained Protein Marker, Broad Range, BioLabs) sont également déposés sur chaque gel. La séparation des protéines se fait par migration électrophorétique (40 V, TA, 18h). Les protéines sont ensuite transférées (100V, 1h, 4°C) sur une membrane de nitrocellulose (Protran, Schleicher&Schuell, 0,22µm), puis l'efficacité du transfert est visualisée par coloration de la membrane au rouge Ponceau (0,2% rouge Ponceau ; 3% TCA). La membrane est ensuite saturée pendant 1h à TA dans une solution de TBS-T (Tris Buffer Saline, Interchim - Tween 0,2%) contenant soit 5% de lait écrémé, soit 5 % de BSA en fonction de l'anticorps utilisé (voir tableau ci-dessous), puis hybridée dans le même tampon avec un anticorps primaire sur la nuit, à 4°C, sous agitation rotative. Après lavages (TBS-T, 5 x 5 min, TA), la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire couplé à l'HRP (Horseradish Peroxidase) (1h, TA, agitation), puis lavée à nouveau (TBS-T, 5 x 15 min, TA). Le couplage de l'anticorps secondaire permet une révélation de la membrane par chimiluminescence (Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection System – GE Healthcare). Les signaux obtenus peuvent être quantifiés à l'aide du logiciel ImageJ.

La membrane peut être ré-hybridée avec un autre anticorps primaire après déshybridation (acide acétique 1%, 15 min, agitation), lavage, et saturation.

4.4. Visualisation des protéines membranaires du globule rouge

Les culots des globules rouges lysés contenant les protéines membranaires sont dénaturés dans du tampon Laemmli (composition en § 4.3.) puis déposés sur gel SDS-PAGE 10%. La migration s'effectue à 40V, TA, sur la nuit. Les protéines sont révélées par une coloration du gel au bleu de Coomassie (0,1% Bleu de Coomassie G250 ; 10% acide acétique glacial ; 40% méthanol). Le gel est

ensuite décoloré (10% acide acétique ; 20% méthanol) puis fixé (10% acide acétique glacial ; 5% glycérol).

4.5. Anticorps utilisés

Anticorps Primaires	Caractéristiques	Références	Utilisation
GATA-1 (N1)	Anticorps monoclonal de rat dirigé contre la partie N-terminale de la protéine GATA-1 murine.	sc-266 – Santa Cruz Biotechnology	WB : 0,2 µg/mL TBS-T-lait 5%
GATA-1 (Sigma)	Anticorps de lapin dirigé contre les acides aminés 394-413 (C-terminal) de la protéine GATA-1 humaine	G 0290 – Sigma	WB : 0,2 µg/mL TBS-T-lait 5%
GATA-1 (H200)	Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre les acides aminés 1-200 de la protéine GATA-1 humaine.	sc-13053 – Santa Cruz Biotechnology	IP : 1 µg/500 µg de protéines
GATA-1pSer^{310}	Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre une courte séquence d'acides aminés contenant la Ser310 phosphorylée de la protéine GATA-1 humaine.	sc-101687 – Santa Cruz Biotechnology	WB : 0,2 µg/mL TBS-T-lait 5% IP : 1 µg/500 µg de protéines
FOG-1 (M-20)	Anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre la partie N-terminale de la protéine FOG-1 murine.	sc-9361 – Santa Cruz Biotechnology	WB : 0,2 µg/mL TBS-T-lait 5%
pRb	Anticorps monoclonal de souris dirigé contre les acides aminés 332-344 de la protéine pRb humaine.	554136 – BD Pharmingen	WB : 1µg/mL TBS-T-lait 5%
Akt1/2/3 (H-136)	Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre les acides aminés 345-480 d'Akt1/2 humaine.	sc-8312 – Santa Cruz Biotechnology	WB : 0,2 µg/mL TBS-T-lait 5%
Phospho-Akt (Ser473)	Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre un peptide phosphorylé comprenant la Ser473 de la protéine Akt murine.	#9271 – Cell Signaling Technology	WB : 0,1 µg/mL TBS-T-BSA 5%
FOXO3A	Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la protéine FKHRL1/FOXO3A humaine.	#07-702 – Millipore	WB : 1 µg/mL TBS-T-lait 5%
GLUT-4	Anticorps monoclonal de souris dirigé contre la partie C-terminale du transporteur de glucose humain GLUT-4	ab65267 – Abcam	WB : 1µg/mL TBS-T-lait 5%
Nucléophosmine B23 (C-19)	Anticorps polyclonal de lapin dirigé la partie C-terminale de la protéine B23 humaine.	sc-6013-R – Santa Cruz Biotechnology	WB : 0,2 µg/mL TBS-T-lait 5% IP : 1 µg/500 µg
Actine	Anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'actine de poulet. Reconnaît un épitope situé dans la partie N-terminale (AA50-70) des six isoformes de l'actine des vertébrés.	MAB1501R – Millipore	WB : 0,2µg/mL TBS-T-lait-5%

Anticorps Secondaires	Caractéristiques	Références	Utilisation
Anti-souris	IgG de chèvre dirigées contre des IgG de souris et conjuguées à l'HRP	115-035-006 – Jackson ImmunoResearch	WB : 0,1µg/mL TBS-T-lait 5%
Anti-lapin	IgG de chèvre dirigées contre des IgG de lapin et conjuguées à l'HRP	111-035-006 – Jackson ImmunoResearch	WB : 0,1µg/mL TBS-T-lait 5%
Anti-chèvre	IgG de lapin dirigées contre des IgG de chèvre et conjuguées à l'HRP	305-036-006 – Jackson ImmunoResearch	WB : 0,1µg/mL TBS-T-lait 5%
Anti-rat	IgG de poulet dirigées contre des IgG de rat et conjuguées à l'HRP	sc-2956 – Santa Cruz Biotechnology	WB : 0,1µg/mL TBS-T-lait 5%

Isotype (IP)	Caractéristiques	Références	Utilisation
Isotype souris	IgG de souris	sc-2025 – Santa Cruz Biotechnology	IP : 1µg/500µg de protéines
Isotype rat	IgG de rat	sc-2026 – Santa Cruz Biotechnology	IP : 1µg/500µg de protéines
Isotype lapin	IgG de lapin	sc-2027 – Santa Cruz Biotechnology	IP : 1µg/500µg de protéines
Isotype chèvre	IgG de chèvre	sc-2028 – Santa Cruz Biotechnology	IP : 1µg/500µg de protéines

5. Biologie moléculaire

5.1. Création des doubles mutants gata-1-V205G-S310A et gata-1-V205G-S310D

Les plasmides MigR-gata-1-V205G-S310A et MigR-gata-1-V205G-S310D ont été créés par mutagenèse dirigée (QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit – Stratagene) à partir des plasmides MigR-gata-1-S310A et MigR-gata-1-S310D, à l'aide d'une amorce contenant la mutation V205G.

Amorce V205G 5' : 5'-GTGAGGCCAGGGAGTGTGGGAACTGCGGAGCAACAGCC-3'

Amorce V205G 3' : 5'-GCTGTTGCTCCGCAGTTCCCACACTCCCTGGCCTCACA-3'

5.2. Extraction d'ADNg

L'ADNg de souris est extrait à partir d'un morceau de queue. L'échantillon est incubé dans 700µL de Tail Mix (50mM Tris pH8 ; 100mM EDTA ; 100mM NaCl ; 1% SDS) + 10µL de protéinase K (20mg/mL), au moins 2h à 56°C. 10µL supplémentaires de protéinase K sont ajoutés, et le mélange est incubé au moins 2h à 56°C. La RNAse est ajoutée au mélange (10µL – 10mg/mL), qui est incubé au moins 2h à 37°C. Après centrifugation (10 sec), l'ADN est extrait au phénol/chloroforme : 730µL de phénol/chloroforme sont ajoutés, le mélange est agité puis centrifugé 5 min à 13000 rpm. La phase aqueuse est récupérée dans un nouveau tube. 210µL d'éthanol 100% sont ajoutés et le mélange est vortexé. L'échantillon est transféré dans une colonne (kit NucleoSpin – Macherey-Nagel). Après

centrifugation (1 min, 11000g), le surnageant est éliminé. L'ADN retenu dans la colonne est lavé avec 500µL de tampon BW (centrifugation 1min, 11000g) puis avec 600µL de tampon B5 (centrifugation 1min, 11000g). La colonne est séchée par une nouvelle centrifugation (1min, 11000g). L'ADN est élué deux fois par 40µL de tampon BE préchauffé à 70°C (centrifugation 1min, 11000g).

5.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

5µL d'ADNg sont mélangés à 20µL de mix PCR. Le mix PCR contient du MgCl2 (1,5mM – Fermentas), de la Taq polymérase (40U/mL – Biolabs), du tampon Taq 10X (Fermentas), une solution de dNTP (0,2mM), des amorces 5' et 3' à 1µM, et de l'eau RNAse+DNAse free (PAA) qsp 20µL/point. Le mélange mix+ADN est alors chauffé 3 min à 94°C pour dénaturer l'ADN. Puis, il subit une phase d'amorce soit 5 cycles de dénaturation/hybridation/élongation à 94°C-1min, 60°C-1min, 72°C-30sec. La phase d'amplification consiste en 30 cycles : 94°C-30sec, 60°C-30sec, 72°C-30sec. Enfin, l'élongation finale est réalisée à 72°C pendant 5 min. La réaction est alors arrêtée à 4°C.
Pour amplifier la région de l'ADN contenant la mutation gata-1-S310A, les amorces utilisées sont les suivantes :

Amorce 5' : 5'-AACCGCCCACTGACCATCAGG-3'

Amorce 3' : 5'-TGTACCTTCAAGAACTGAGTGG-3'

5.4. Extraction ARN

Les cellules sont resuspendues dans 1mL de TRIzol® Reagent (Invitrogen) et lysées par pipetages répétés. Après incubation (5 min, 20°C) et ajout de 270µL de chloroforme, le mélange est vortexé, incubé 15 min à 20°C et centrifugé (12000g, 15 min). La phase aqueuse est prélevée et les ARNs sont précipités par addition d'un volume d'isopropanol. Les échantillons sont incubés 10 min à 20°C puis centrifugés (12000g, 10 min) et les ARNs sont lavés une fois par addition d'éthanol à 75% (7500g, 5 min). Le culot d'ARN est alors dissous dans 20µL d'eau traitée au DEPC (Invitrogen) et conservés à -80°C.

5.5. RT-qPCR

Les ARNs subissent un traitement à la DNAse (kit DNAse I Amplification Grade – Invitrogen) afin d'éliminer toute trace d'ADN dans la préparation. Pour cela, 20 µL d'ARN sont incubés avec 2,5µL de

DNAse I buffer et 1µL de DNAse I pendant 15 min maximum à température ambiante. 1µL d'EDTA 25mM est ajouté et le mélange est incubé 10 min à 65°C. Les ARNS sont conservés à -80°C.

Les ARNs sont ensuite soumis à une transcription réverse (RT) à l'aide du kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen). 10µL d'ARN sont incubés 10 min à 70°C, puis conservés dans la glace. 10µL de Reaction Mix et 2µL de RT sont ajoutés, et le mélange est incubé 15 min à 25°C, 45 min à 50°C, 5 min à 85°C et conservé dans la glace. Après centrifugation rapide, 1µL de RNAse H est ajouté. Le mélange est incubé 20 min à 37°C. Les ADNc obtenus sont conservés à -20°C.

La PCR quantitative est réalisé à l'aide du kit qPCR MasterMix Plus dTTP (Eurogentec). Les ADNc sont dilués au 1/5e (20µL + 80µL d'H_2O), puis 2µL d'ADNc dilué sont mélangés à 23µL de Mix qPCR dans chaque puits (plaque 96). Pour un point, le Mix qPCR est composé de 1,25µL de sonde (20X), 12,5µL de mix PCR 2X (kit qPCR MasterMix Plus dTTP – Eurogentec), et 9,25µL d'H_2O. La réaction est effectuée dans l'appareil 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) à l'aide du logiciel 7500 Software (Applied Biosystems). Ce même logiciel est utilisé pour l'analyse des données.

6. Lignées murines

6.1. Etablissement des lignées

Les souris transgéniques et contrôles nous ont été fournies par les Drs S.H. Orkin (Harvard Medical School, Boston) et S. Ghaffari (Mount Sinaï School of Medicine, New York). Elles sont issues d'une lignée congénique établie sur plusieurs générations (> à 12) et ont été obtenues par décongélation d'embryons (**Figure 67**).

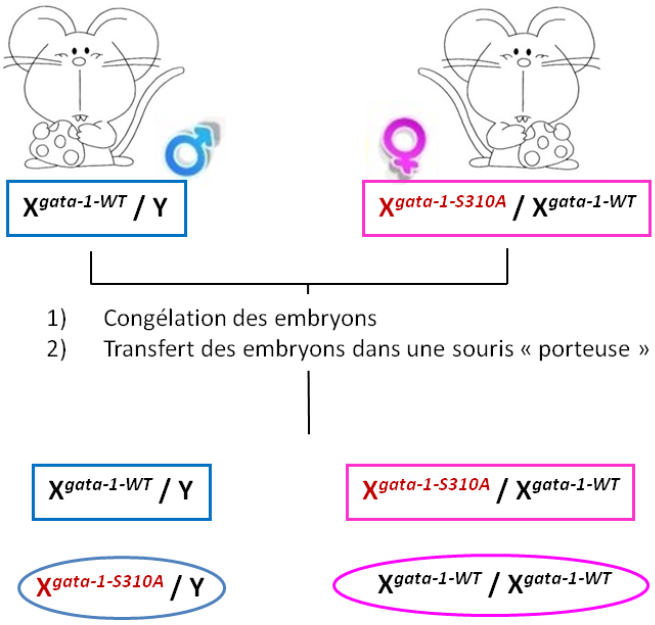


Figure 67 : <u>Obtention des individus fondateurs par décongélation d'embryons (S.H. Orkin et S. Ghaffari)</u>
Afin d'obtenir des individus gata-1-S310A et contrôles dans une même portée, les embryons ont été générés par croisement d'un mâle sauvage ($X^{gata\text{-}1\text{-}WT/Y}$) et d'une femelle hétérozygote ($X^{gata\text{-}1\text{-}S310A}/X^{gata\text{-}1\text{-}WT}$) puis congelés. Après décongélation, les embryons ont été transplantés dans une souris « porteuse ». On obtient alors des individus des quatre génotypes indiqués. Trois mâles $X^{gata\text{-}1\text{-}S310A}/Y$ et trois femelles $X^{gata\text{-}1\text{-}WT}/X^{gata\text{-}1\text{-}WT}$ (encerclés) nous ont été envoyés.

GATA-1 étant porté par le chromosome X, il n'était pas possible d'obtenir tous les génotypes dans une même portée par le croisement classique de deux individus hétérozygotes. Les embryons ont donc été générés par croisement d'une femelle hétérozygote avec un mâle sauvage de la même lignée. On obtient alors des mâles gata-1-S310A et sauvages ainsi que des femelles hétérozygotes et sauvages après transplantation dans une souris porteuse.

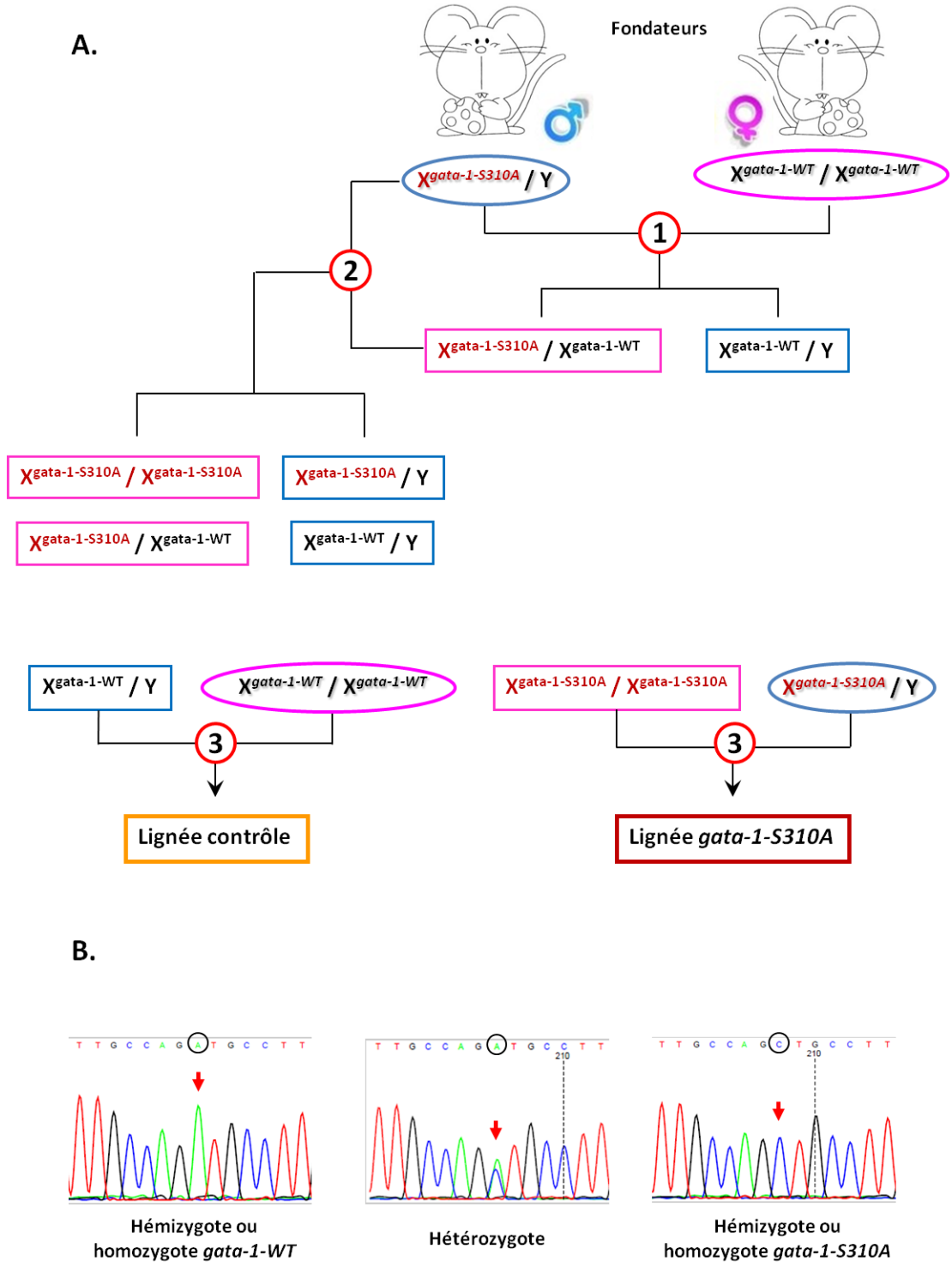


Figure 68 : Etablissement de deux lignées consanguines contrôle et gata-1-S310A
A. Trois mâles $X^{gata\text{-}1\text{-}S310A}/Y$ et trois femelles $X^{gata\text{-}1\text{-}WT}/X^{gata\text{-}1\text{-}WT}$ (Fondateurs) nous été envoyés au laboratoire. Trois types de croisements successifs ont été réalisés afin d'obtenir deux lignées homozygotes de même fond génétique. Croisement 1 : les fondateurs sont croisés entre eux. Croisement 2 : les femelles hétérozygotes obtenues sont recroisées avec les mâles fondateurs (back-cross). Croisements 3 : les mâles sauvages et les femelles homozygotes *gata-1-S310A* issus du croisement 2 sont recroisés (back-cross) avec les fondateurs femelles sauvages et mâles *gata-1-S310A* respectivement. Les individus ainsi obtenus dans chaque croisement sont croisés entre eux afin d'établir deux lignées consanguines : la lignée contrôle (gata-1-WT) et la lignée gata-1-S310A. **B.** Les génotypes sont déterminés par PCR puis séquençage. Le nucléotide ciblé par la mutation est entouré (A : allèle sauvage ; C : allèle *gata-1-S310A*). La flèche indique le pic correspondant. Chez les individus hétérozygotes, on observe la superposition de deux pics, indiquant la présence des deux allèles.

Trois mâles $X^{gata\text{-}1\text{-}S310A}/Y$ et trois femelles $X^{gata\text{-}1\text{-}WT}/X^{gata\text{-}1\text{-}WT}$ ont été envoyés au laboratoire. Ces six individus fondateurs nous ont permis d'établir deux lignées homozygotes : une lignée **gata-1-S310A** et une lignée **contrôle** (gata-1-WT). Le génotype des fondateurs ne nous ayant pas permis d'obtenir ces lignées par croisement direct des fondateurs entre eux, nous avons du effectuer plusieurs croisements successifs qui sont résumés dans la **Figure 68A**. Les fondateurs ont été accouplés entre eux (croisement 1) pour obtenir une première génération composée de femelles hétérozygotes et de mâles sauvages. Les femelles hétérozygotes ont alors été croisées avec les mâles fondateurs $X^{gata\text{-}1\text{-}S310A}/Y$ (back-cross, croisement 2) de manière à obtenir une génération constituée de quatre génotypes différents. Les génotypes de ces individus ont été déterminés par PCR puis séquençage (**Figure 68B**). Finalement, les femelles homozygotes *gata-1-S310A* d'une part, et les mâles sauvages d'autre part ont été recroisés avec les fondateurs (back-cross, croisements 3) afin de constituer deux lignées distinctes de même fond génétique. Les individus ainsi obtenus sont alors croisés entre eux afin d'obtenir deux lignées consanguines : la lignée **gata-1-S310A** et la lignée **contrôle** (gata-1-WT).

6.2. Entretien des lignées

Pour chaque accouplement, le mâle est isolé pendant 24h puis mis en présence de la femelle. Six semaines après la naissance, les mâles et femelles de la portée sont séparés.

Pour déterminer le génotype des individus, une extraction d'ADNg est réalisée à partir de l'extrémité de la queue. Une PCR est ensuite réalisée afin d'amplifier la séquence contenant le site de la mutation gata-1-S310A. Le génotype des individus est déterminé par séquençage des produits de PCR par la société Beckman Coulter Genomics à l'aide de l'amorce suivante :

Amorce gata-1-S310A : 5'-CCCAGCAGAGGTCCAGGAAA-3'

6.3. Isolement des cellules érythroïdes

6.3.1. Foies fœtaux

Les femelles gestantes sont sacrifiées puis les embryons sont récupérés. Le foie de chaque embryon est isolé puis dissocié dans 1mL de PBS à l'aide d'une seringue (aiguille de 18G puis de 23G). La suspension est filtrée sur une membrane de nylon de 30µm. Les hépatocytes (40µm) sont retenus par le filtre, tandis les cellules érythroïdes (20-25µm) sont récupérées dans le filtrat.

6.3.2. Moelle

Les souris sont sacrifiées et les deux fémurs, les deux tibias, les deux humérus ainsi que les deux os du bassin sont récupérés. Tous les os récupérés sont alors « flushés » avec du PBS à l'aide d'une seringue et d'une aiguille de 23G pour vider la cavité et récupérer les cellules de moelle. La suspension cellulaire est filtrée sur membrane de nylon de 30µm pour éliminer les débris osseux.

6.3.3. Rate

La rate des souris est récupérée, coupée en morceaux à l'aide d'un scalpel, puis dissociée dans du PBS à l'aide d'une seringue et d'une aiguille (18G puis 23G). La suspension cellulaire est filtrée sur membrane de nylon de 30µm pour éliminer les amas.

6.4. Analyses clonogéniques

Les cellules de foies fœtaux, moelle ou rate sont ensemencées dans une méthyl-cellulose (MethoCult® M3234 ou M3231 – StemCell Technologies) à 10^5 cellules/puits (plaque 6 puits). Selon les conditions, le milieu est supplémenté par de l'Epo recombinante humaine à 2U/mL sauf autre indication (rhEpo – Roche Molecular Biochemicals), du SCF murin à 10ng/mL (mSCF – Peprotech), de l'insuline à 10µg/mL (Sigma), de l'IGF-1 à 0,5µg/mL (Increlex®) ou de l'holotransferrine humaine à 200µg/mL (Sigma). Les colonies BFU-e obtenues sont dénombrées après 14 jours.

6.5. Mesure de la durée de vie des globules rouges *in vivo*

Les globules rouges sont marqués *in vivo* à J0 par la NHS-biotine. Le pourcentage d'érythrocytes marqués est mesuré régulièrement. 25 mg de NHS-biotine (N-hydrosuccinimide-biotin – H1759 Sigma) ont été repris dans 500µL de N,-N,-diméthylacétamide pour obtenir une solution à 50mg/mL. Cette solution a été diluée dans du PBS et injectée aux souris à raison de 50mg/kg en intraveineuse par voie rétro-orbitale. Des prélèvements sanguins sont réalisés régulièrement après l'injection. Le pourcentage de globules rouges biotinylés est calculé en déterminant par cytométrie la fraction de cellules Ter119-positives qui sont également positives pour la streptavidine-FITC. A chaque prélèvement, la valeur obtenue est rapportée à la valeur mesurée à J0. La durée de vie des globules rouges correspond à la durée nécessaire à la disparition complète des érythrocytes biotinylés.

6.6. Protocole Picropodophylline (PPP)

Deux cohortes constituées chacune de quatre mâles contrôles et quatre mâles gata-1-S310A, âgés de 12 semaines, ont été définies : l'une a été traitée à la Picropodophylline (PPP) à raison de 10mg/kg/12h pendant 20 jours, tandis que l'autre a reçu du DMSO 5% selon le même protocole. Le PPP (Sigma) est repris à 50 mM dans du DMSO puis conservé à -20°C. Avant chaque injection, 90µL de PPP sont dilués dans 1,8mL de NaCl 0,9% de manière à obtenir une solution à 1mg/mL. 200µL de cette solution sont injectés en intra-péritonéale à chaque individu de la cohorte PPP toutes les 12h pendant 20 jours. Pour la cohorte DMSO, 200µL d'une solution saline 5% DMSO sont injectés à chaque individu toutes les 12h pendant 20 jours.

6.7. Analyse histologique

Les organes prélevés (rate et foie) sont immédiatement fixés dans le formol. Après inclusion en paraffine, des coupes sont réalisées au microtome et déposées sur lame. Les coupes sont alors déparaffinées et réhydratées par une succession de bains (xylène, alcool de 100% à 70%, puis eau), et colorées en Hématoxyline/Eosine (HE) ou Perls. Après montage, les lames sont observées au microscope optique.

6.8. Incorporation du glucose

L'incorporation du glucose des globules rouges a été mesurée à l'aide du kit Glucose Uptake Cell-Based Assay Kit (Cayman Chemical). Le sang est prélevé et lavé 3 fois pour éliminer le sérum. 2.10^5 ou 5.10^5 globules rouges sont mis en culture dans 100µL de milieu RPMI sans glucose. L'apigénine, un inhibiteur de l'incorporation du glucose, a été utilisée comme contrôle négatif. Elle est ajoutée ou non au milieu de culture à une concentration de 100µM. Puis, un analogue du glucose couplé à un fluorochrome (2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose ou 2-NBD-glucose) est ajouté au milieu à une concentration de 100µg/mL. Les cellules sont incubées 30 minutes à 37°C, lavées puis la fluorescence (excitation : 485nm ; émission : 535nm) est mesurée par un lecteur de plaque (Mithras, Berthold).

6.9. Dosage de l'IGF-1 sérique

Le taux d'IGF-1 sérique a été mesuré à l'aide d'un test ELISA (Quantikine® ELISA Mouse/Rat IGF-1 Immunoassay – R&D Systems). Des prélèvements sanguins ont été réalisés sur des souris contrôles et gata-1-S310A mâles âgés de 12 semaines et femelles âgées de 20 semaines. Le sérum a été récupéré par centrifugation (2000g, 15 min). Les échantillons sont dilués 500 fois, 100µL sont disposés dans la plaque contenant l'anticorps spécifique de l'IGF-1 et incubés 2h à TA sous agitation. Après 5 lavages, l'anticorps anti-IGF-1 couplé à l'HRP (100µL) est ajouté dans chaque puits, la plaque est incubée 2h à TA sous agitation. Après 5 lavages, 100µL de substrat sont ajoutés. La plaque est incubée 30 min à TA à l'abri de la lumière. 100µL de solution Stop sont ajoutés pour arrêter la réaction. La densité optique est déterminée dans les 30 min par un lecteur de plaque à 450nm (Mithras, Berthold).

6.10. Transplantation de cellules de moelle

6.10.1. Isolement et marquage de cellules Lin- par transduction

Les cellules de moelle d'un mâle contrôle et d'un mâle gata-1-S310A âgés de 12 semaines sont récupérées comme indiqué dans le paragraphe 6.3.2. Après centrifugation (300g, 10min), les cellules sont reprises dans 5mL de PBE (PBS, BSA 0,5%, EDTA 2mM). 5mL d'ACK (NH_4Cl 150mM ; $KHCO_3$ 1mM ; Na_2EDTA 0,1mM) sont ajoutés pour lyser les globules rouges. La suspension est incubée 5min à TA. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et les cellules sont reprises dans 1mL de PBE. Les cellules Lin- (Lineage-négatives) sont isolées par tri magnétique à l'aide du kit Lineage Cell Depletion Kit – mouse (Miltenyi Biotec). Les cellules ainsi isolées sont mises en culture à 5.10^4 cellules/100µL/puits dans une plaque 96 puits à fond rond non traitée dans un milieu IMDM contenant des antibiotiques (pénicilline 100U/mL, streptomycine 100µg/mL, PAA), 15% de BIT (BIT 9500 Serum Substitute – StemCell Technologies), de l'IL-3 murine (20ng/mL – Peprotech), du SCF murin (100ng/mL – Peprotech), de l'IL-6 humaine (10ng/mL – Peprotech), de la TPO humaine (100ng/mL – Peprotech) et du FLT3-Ligand (100ng/mL – Peprotech).

24h après la mise en culture, les cellules Lin- contrôles et gata-1-S310A sont transduites en présence de Protamine Sulfate (5µg/mL) par les vecteurs lentiviraux ptrip-mnd-gfp ou ptrip-mnd-mcherry.

24h après transduction, le taux de transduction (GFP+ ou mCherry+) est évalué par cytométrie. Les cellules contrôle-GFP et gata-1-S310A-mCherry sont poolées en quantité équivalente. Les cellules contrôle-mCherry et gata-1-S310A-GFP sont poolées en quantité équivalente.

6.10.2. Irradiation et transplantation des souris receveuses

La veille de la transplantation, les 8 mâles contrôle receveurs âgés de 12 semaines subissent deux irradiations létales à 3h d'intervalle (2 x 5,5Gy à 1Gy/min) sous anesthésie. Ils seront traités à la Néomycine (2g/L dans l'eau) pendant 15 jours.

Lors de la transplantation, 150.10^3 cellules Lin- transduites sont injectées à chaque mâle receveur en intraveineuse par voie rétro-orbitale selon le protocole suivant :

- Groupe 1 : cellules Lin- contrôle-GFP + cellules Lin- gata-1-S310A-mCherry
- Groupe 2 : cellules Lin- contrôle-mCherry + cellules Lin- gata-1-S310A-GFP

BIBLIOGRAPHIE

Ahmed, N.N., Franke, T.F., Bellacosa, A., Datta, K., Gonzalez-Portal, M.E., Taguchi, T., Testa, J.R., and Tsichlis, P.N. (1993). The proteins encoded by c-akt and v-akt differ in post-translational modification, subcellular localization and oncogenic potential. Oncogene *8*, 1957–1963.

An, X., Lecomte, M.C., Chasis, J.A., Mohandas, N., and Gratzer, W. (2002). Shear-response of the spectrin dimer-tetramer equilibrium in the red blood cell membrane. J. Biol. Chem. *277*, 31796–31800.

An, X., Debnath, G., Guo, X., Liu, S., Lux, S.E., Baines, A., Gratzer, W., and Mohandas, N. (2005). Identification and functional characterization of protein 4.1R and actin-binding sites in erythrocyte beta spectrin: regulation of the interactions by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. Biochemistry *44*, 10681–10688.

Anguita, E., Hughes, J., Heyworth, C., Blobel, G.A., Wood, W.G., and Higgs, D.R. (2004). Globin gene activation during haemopoiesis is driven by protein complexes nucleated by GATA-1 and GATA-2. EMBO J. *23*, 2841–2852.

Anttila, R., Koistinen, R., Seppälä, M., Koistinen, H., and Siimes, M.A. (1994). Insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 3 as determinants of blood hemoglobin concentration in healthy subjects. Pediatr. Res. *36*, 745–748.

Arcasoy, M.O., and Jiang, X. (2005). Co-operative signalling mechanisms required for erythroid precursor expansion in response to erythropoietin and stem cell factor. Br. J. Haematol. *130*, 121–129.

Austin, J.H., and Drabkin, D.L. (1935). SPECTROPHOTOMETRIC STUDIES. III. METHEMOGLOBIN. Journal of Biological Chemistry *112*, 67.

Bakker, W.J., Blázquez-Domingo, M., Kolbus, A., Besooyen, J., Steinlein, P., Beug, H., Coffer, P.J., Löwenberg, B., Von Lindern, M., and Van Dijk, T.B. (2004). FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1. J. Cell Biol. *164*, 175–184.

Bartůnek, P., Králová, J., Blendinger, G., Dvorák, M., and Zenke, M. (2003). GATA-1 and c-myb crosstalk during red blood cell differentiation through GATA-1 binding sites in the c-myb promoter. Oncogene *22*, 1927–1935.

Bauer, A., Tronche, F., Wessely, O., Kellendonk, C., Reichardt, H.M., Steinlein, P., Schütz, G., and Beug, H. (1999). The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis. Genes Dev. *13*, 2996–3002.

Belfiore, A., Genua, M., and Malaguarnera, R. (2009). PPAR-γ agonists and their effects on IGF-I receptor signaling: Implications for cancer. PPAR Res *2009*, 830501.

Bentov, I., Narla, G., Schayek, H., Akita, K., Plymate, S.R., LeRoith, D., Friedman, S.L., and Werner, H. (2008). Insulin-like growth factor-i regulates Kruppel-like factor-6 gene expression in a p53-dependent manner. Endocrinology *149*, 1890–1897.

Biggs, W.H., 3rd, Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W.K., and Arden, K.C. (1999). Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *96*, 7421–7426.

Birkmann, J., Oez, S., Smetak, M., Kaiser, G., Kappauf, H., and Gallmeier, W.M. (1997). 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 *15*, 18–32.

Blobel, G.A., Nakajima, T., Eckner, R., Montminy, M., and Orkin, S.H. (1998). CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *95*, 2061–2066.

Boulanger, L., Sabatino, D.E., Wong, E.Y., Cline, A.P., Garrett, L.J., Garbarz, M., Dhermy, D., Bodine, D.M., and Gallagher, P.G. (2002). Erythroid expression of the human alpha-spectrin gene promoter is mediated by GATA-1- and NF-E2-binding proteins. J. Biol. Chem. *277*, 41563–41570.

Bouscary, D., Pene, F., Claessens, Y.-E., Muller, O., Chrétien, S., Fontenay-Roupie, M., Gisselbrecht, S., Mayeux, P., and Lacombe, C. (2003). Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. Blood *101*, 3436–3443.

Boyer, S.H., Bishop, T.R., Rogers, O.C., Noyes, A.N., Frelin, L.P., and Hobbs, S. (1992). Roles of erythropoietin, insulin-like growth factor 1, and unidentified serum factors in promoting maturation of purified murine erythroid colony-forming units. Blood *80*, 2503–2512.

Boyes, J., Byfield, P., Nakatani, Y., and Ogryzko, V. (1998). Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. Nature *396*, 594–598.

Broudy, V.C., Lin, N.L., Priestley, G.V., Nocka, K., and Wolf, N.S. (1996). Interaction of stem cell factor and its receptor c-kit mediates lodgment and acute expansion of hematopoietic cells in the murine spleen. Blood *88*, 75–81.

Broudy, V.C., Lin, N.L., Bühring, H.J., Komatsu, N., and Kavanagh, T.J. (1998). Analysis of c-kit receptor dimerization by fluorescence resonance energy transfer. Blood *91*, 898–906.

Bruce, L.J., Beckmann, R., Ribeiro, M.L., Peters, L.L., Chasis, J.A., Delaunay, J., Mohandas, N., Anstee, D.J., and Tanner, M.J.A. (2003). A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. Blood *101*, 4180–4188.

Brugnara, C. (1997). Erythrocyte membrane transport physiology. Curr. Opin. Hematol. *4*, 122–127.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. Cell *96*, 857–868.

Buitenhuis, M. (2011). The role of PI3K/protein kinase B (PKB/c-akt) in migration and homing of hematopoietic stem and progenitor cells. Curr. Opin. Hematol. *18*, 226–230.

Buitenhuis, M., and Coffer, P.J. (2009). The role of the PI3K-PKB signaling module in regulation of hematopoiesis. Cell Cycle *8*, 560–566.

Byers, S.L., Wiles, M.V., Dunn, S.L., and Taft, R.A. (2012). Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. PLoS ONE *7*, e35538.

Caligioni, C.S. (2009). Assessing reproductive status/stages in mice. Curr Protoc Neurosci *Appendix 4*, Appendix 4I.

Calligaris, R., Bottardi, S., Cogoi, S., Apezteguia, I., and Santoro, C. (1995). Alternative translation initiation site usage results in two functionally distinct forms of the GATA-1 transcription factor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *92*, 11598–11602.

Camaschella, C., Roetto, A., Calì, A., De Gobbi, M., Garozzo, G., Carella, M., Majorano, N., Totaro, A., and Gasparini, P. (2000). The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. Nat. Genet. *25*, 14–15.

Cantor, A.B., and Orkin, S.H. (2002). Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. Oncogene *21*, 3368–3376.

Cantor, A.B., and Orkin, S.H. (2005). Coregulation of GATA factors by the Friend of GATA (FOG) family of multitype zinc finger proteins. Semin. Cell Dev. Biol. *16*, 117–128.

Castrillon, D.H., Miao, L., Kollipara, R., Horner, J.W., and DePinho, R.A. (2003). Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. Science *301*, 215–218.

Catanese, V.M., Grigorescu, F., King, G.L., and Kahn, C.R. (1986). The human erythrocyte insulin-like growth factor I receptor: characterization and demonstration of ligand-stimulated autophosphorylation. J. Clin. Endocrinol. Metab. *62*, 692–699.

Chang, A.N., Cantor, A.B., Fujiwara, Y., Lodish, M.B., Droho, S., Crispino, J.D., and Orkin, S.H. (2002). GATA-factor dependence of the multitype zinc-finger protein FOG-1 for its essential role in megakaryopoiesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *99*, 9237–9242.

Chapman, V.M., Stephenson, D.A., Mullins, L.J., Keitz, B.T., Disteche, C., and Orkin, S.H. (1991). Linkage of the erythroid transcription factor gene (Gf-1) to the proximal region of the X chromosome of mice. Genomics *9*, 309–313.

Chasis, J.A., and Mohandas, N. (2008). Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. Blood *112*, 470–478.

Chaudhuri, A., Zbrzezna, V., Polyakova, J., Pogo, A.O., Hesselgesser, J., and Horuk, R. (1994). Expression of the Duffy antigen in K562 cells. Evidence that it is the human erythrocyte chemokine receptor. J. Biol. Chem. *269*, 7835–7838.

Chen, K., Liu, J., Heck, S., Chasis, J.A., An, X., and Mohandas, N. (2009). Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 17413–17418.

Chen, W.S., Xu, P.Z., Gottlob, K., Chen, M.L., Sokol, K., Shiyanova, T., Roninson, I., Weng, W., Suzuki, R., Tobe, K., et al. (2001). Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. Genes Dev. *15*, 2203–2208.

Cheung, P., Tanner, K.G., Cheung, W.L., Sassone-Corsi, P., Denu, J.M., and Allis, C.D. (2000). Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. Mol. Cell *5*, 905–915.

Chiba, T., Ikawa, Y., and Todokoro, K. (1991). GATA-1 transactivates erythropoietin receptor gene, and erythropoietin receptor-mediated signals enhance GATA-1 gene expression. Nucleic Acids Res. *19*, 3843–3848.

Chlon, T.M., and Crispino, J.D. (2012). Combinatorial regulation of tissue specification by GATA and FOG factors. Development *139*, 3905–3916.

Chlon, T.M., Doré, L.C., and Crispino, J.D. (2012). Cofactor-Mediated Restriction of GATA-1 Chromatin Occupancy Coordinates Lineage-Specific Gene Expression. Molecular Cell.

Chretien, S., Dubart, A., Beaupain, D., Raich, N., Grandchamp, B., Rosa, J., Goossens, M., and Romeo, P.H. (1988). Alternative transcription and splicing of the human porphobilinogen deaminase gene result either in tissue-specific or in housekeeping expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *85*, 6–10.

Ciovacco, W.A., Raskind, W.H., and Kacena, M.A. (2008). Human phenotypes associated with GATA-1 mutations. Gene *427*, 1–6.

Clark, A.J., Doyle, K.M., and Humbert, P.O. (2004). Cell-intrinsic requirement for pRb in erythropoiesis. Blood *104*, 1324–1326.

Clarke, A.R., Maandag, E.R., Van Roon, M., Van der Lugt, N.M., Van der Valk, M., Hooper, M.L., Berns, A., and Te Riele, H. (1992). Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. Nature *359*, 328–330.

Classon, M., and Harlow, E. (2002). The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. Nat. Rev. Cancer *2*, 910–917.

Collavin, L., Gostissa, M., Avolio, F., Secco, P., Ronchi, A., Santoro, C., and Del Sal, G. (2004). Modification of the erythroid transcription factor GATA-1 by SUMO-1. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *101*, 8870–8875.

Correa, P.N., and Axelrad, A.A. (1991). Production of erythropoietic bursts by progenitor cells from adult human peripheral blood in an improved serum-free medium: role of insulinlike growth factor 1. Blood *78*, 2823–2833.

Correa, P.N., Eskinazi, D., and Axelrad, A.A. (1994). Circulating erythroid progenitors in polycythemia vera are hypersensitive to insulin-like growth factor-1 in vitro: studies in an improved serum-free medium. Blood *83*, 99–112.

Coulon, S., Dussiot, M., Grapton, D., Maciel, T.T., Wang, P.H.M., Callens, C., Tiwari, M.K., Agarwal, S., Fricot, A., Vandekerckhove, J., et al. (2011). Polymeric IgA1 controls erythroblast proliferation and accelerates erythropoiesis recovery in anemia. Nat. Med. *17*, 1456–1465.

Courtois, G., Vandekerckhove, J., Dussiot, M., Kersual, J., Coulon, S., Belaid, Z., Zermati, Y., Ribeil, J.-A., and Hermine, O. (2007). L'érythropoïèse tardive : une mort avortée ? Hématologie *13*, 400–408.

Crispino, J.D. (2005). GATA1 in normal and malignant hematopoiesis. Semin. Cell Dev. Biol. *16*, 137–147.

Crispino, J.D., Lodish, M.B., MacKay, J.P., and Orkin, S.H. (1999). Use of altered specificity mutants to probe a specific protein-protein interaction in differentiation: the GATA-1:FOG complex. Mol. Cell *3*, 219–228.

Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature *378*, 785–789.

Crossley, M., and Orkin, S.H. (1994). Phosphorylation of the erythroid transcription factor GATA-1. J. Biol. Chem. *269*, 16589–16596.

Crossley, M., Tsang, A.P., Bieker, J.J., and Orkin, S.H. (1994). Regulation of the erythroid Kruppel-like factor (EKLF) gene promoter by the erythroid transcription factor GATA-1. J. Biol. Chem. *269*, 15440–15444.

Crossley, M., Merika, M., and Orkin, S.H. (1995). Self-association of the erythroid transcription factor GATA-1 mediated by its zinc finger domains. Mol. Cell. Biol. *15*, 2448–2456.

Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. Cell *91*, 231–241.

Debril, M.B., Renaud, J.P., Fajas, L., and Auwerx, J. (2001). The pleiotropic functions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. J. Mol. Med. *79*, 30–47.

Van Der Heide, L.P., Hoekman, M.F.M., and Smidt, M.P. (2004). The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. Biochem. J. *380*, 297–309.

Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.W., Koenderman, L., and Coffer, P.J. (2000a). Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. Curr. Biol. *10*, 1201–1204.

Dijkers, P.F., Medema, R.H., Pals, C., Banerji, L., Thomas, N.S., Lam, E.W., Burgering, B.M., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., Koenderman, L., et al. (2000b). Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). Mol. Cell. Biol. *20*, 9138–9148.

Dimitriadis, G., Maratou, E., Boutati, E., Kollias, A., Tsegka, K., Alevizaki, M., Peppa, M., Raptis, S.A., and Hadjidakis, D.J. (2008). IGF-I increases the recruitment of GLUT4 and GLUT3 glucose transporters on cell surface in hyperthyroidism. Eur. J. Endocrinol. *158*, 361–366.

Dirlam, A., Spike, B.T., and Macleod, K.F. (2007). Deregulated E2f-2 underlies cell cycle and maturation defects in retinoblastoma null erythroblasts. Mol. Cell. Biol. *27*, 8713–8728.

Douay, L., and Andreu, G. (2007). Ex vivo production of human red blood cells from hematopoietic stem cells: what is the future in transfusion? Transfus Med Rev *21*, 91–100.

Drissen, R., Von Lindern, M., Kolbus, A., Driegen, S., Steinlein, P., Beug, H., Grosveld, F., and Philipsen, S. (2005). The erythroid phenotype of EKLF-null mice: defects in hemoglobin metabolism and membrane stability. Mol. Cell. Biol. *25*, 5205–5214.

Drissen, R., Guyot, B., Zhang, L., Atzberger, A., Sloane-Stanley, J., Wood, B., Porcher, C., and Vyas, P. (2010). Lineage-specific combinatorial action of enhancers regulates mouse erythroid Gata1 expression. Blood *115*, 3463–3471.

Du, W., and Pogoriler, J. (2006). Retinoblastoma family genes. Oncogene *25*, 5190–5200.

Dubart, A., Roméo, P.H., Vainchenker, W., and Dumenil, D. (1996). Constitutive expression of GATA-1 interferes with the cell-cycle regulation. Blood *87*, 3711–3721.

Eber, S., and Lux, S.E. (2004). Hereditary spherocytosis--defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer. Semin. Hematol. *41*, 118–141.

Ebert, B.L., and Bunn, H.F. (1999). Regulation of the erythropoietin gene. Blood *94*, 1864–1877.

Eisbacher, M., Holmes, M.L., Newton, A., Hogg, P.J., Khachigian, L.M., Crossley, M., and Chong, B.H. (2003). Protein-protein interaction between Fli-1 and GATA-1 mediates synergistic expression of megakaryocyte-specific genes through cooperative DNA binding. Mol. Cell. Biol. *23*, 3427–3441.

Elagib, K.E., Racke, F.K., Mogass, M., Khetawat, R., Delehanty, L.L., and Goldfarb, A.N. (2003). RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. Blood *101*, 4333–4341.

Eleouet, J.F., and Roméo, P.H. (1993). CCACC-binding or simian-virus-40-protein-1-binding proteins cooperate with human GATA-1 to direct erythroid-specific transcription and to mediate 5' hypersensitive site 2 sensitivity of a TATA-less promoter. Eur. J. Biochem. *212*, 763–770.

Evans, E., Mohandas, N., and Leung, A. (1984). Static and dynamic rigidities of normal and sickle erythrocytes. Major influence of cell hemoglobin concentration. J. Clin. Invest. *73*, 477–488.

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

Fernández-Morales, B., Pavón, L., and Calés, C. (2012). CDC6 expression is regulated by lineage-specific transcription factor GATA1. Cell Cycle *11*.

Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M., and Philipsen, S. (2005). GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. Mol. Cell. Biol. *25*, 1215–1227.

Fleming, R.E., Ahmann, J.R., Migas, M.C., Waheed, A., Koeffler, H.P., Kawabata, H., Britton, R.S., Bacon, B.R., and Sly, W.S. (2002). Targeted mutagenesis of the murine transferrin receptor-2 gene produces hemochromatosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *99*, 10653–10658.

Forejtnikovà, H., Vieillevoye, M., Zermati, Y., Lambert, M., Pellegrino, R.M., Guihard, S., Gaudry, M., Camaschella, C., Lacombe, C., Roetto, A., et al. (2010). Transferrin receptor 2 is a component of the erythropoietin receptor complex and is required for efficient erythropoiesis. Blood *116*, 5357–5367.

Fox, A.H., Kowalski, K., King, G.F., Mackay, J.P., and Crossley, M. (1998). Key residues characteristic of GATA N-fingers are recognized by FOG. J. Biol. Chem. *273*, 33595–33603.

Fox, A.H., Liew, C., Holmes, M., Kowalski, K., Mackay, J., and Crossley, M. (1999). Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. EMBO J. *18*, 2812–2822.

Fraser, S.T., Isern, J., and Baron, M.H. (2007). Maturation and enucleation of primitive erythroblasts during mouse embryogenesis is accompanied by changes in cell-surface antigen expression. Blood *109*, 343–352.

Freson, K., Devriendt, K., Matthijs, G., Van Hoof, A., De Vos, R., Thys, C., Minner, K., Hoylaerts, M.F., Vermylen, J., and Van Geet, C. (2001). Platelet characteristics in patients with X-linked macrothrombocytopenia because of a novel GATA1 mutation. Blood *98*, 85–92.

Freson, K., Matthijs, G., Thys, C., Mariën, P., Hoylaerts, M.F., Vermylen, J., and Van Geet, C. (2002). Different substitutions at residue D218 of the X-linked transcription factor GATA1 lead to altered clinical severity of macrothrombocytopenia and anemia and are associated with variable skewed X inactivation. Hum. Mol. Genet. *11*, 147–152.

Fujiwara, Y., Browne, C.P., Cunniff, K., Goff, S.C., and Orkin, S.H. (1996). Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *93*, 12355–12358.

Gao, J., Chen, J., Kramer, M., Tsukamoto, H., Zhang, A.-S., and Enns, C.A. (2009). Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. Cell Metab. *9*, 217–227.

Garriga-Canut, M., and Orkin, S.H. (2004). Transforming acidic coiled-coil protein 3 (TACC3) controls friend of GATA-1 (FOG-1) subcellular localization and regulates the association between GATA-1 and FOG-1 during hematopoiesis. J. Biol. Chem. *279*, 23597–23605.

Geron, I., Abrahamsson, A.E., Barroga, C.F., Kavalerchik, E., Gotlib, J., Hood, J.D., Durocher, J., Mak, C.C., Noronha, G., Soll, R.M., et al. (2008). Selective inhibition of JAK2-driven erythroid differentiation of polycythemia vera progenitors. Cancer Cell *13*, 321–330.

Ghaffari, S., Kitidis, C., Zhao, W., Marinkovic, D., Fleming, M.D., Luo, B., Marszalek, J., and Lodish, H.F. (2006). AKT induces erythroid-cell maturation of JAK2-deficient fetal liver progenitor cells and is required for Epo regulation of erythroid-cell differentiation. Blood *107*, 1888–1891.

Giacinti, C., and Giordano, A. (2006). RB and cell cycle progression. Oncogene *25*, 5220–5227.

Girnita, A., Girnita, L., Del Prete, F., Bartolazzi, A., Larsson, O., and Axelson, M. (2004). Cyclolignans as inhibitors of the insulin-like growth factor-1 receptor and malignant cell growth. Cancer Res. *64*, 236–242.

Girnita, A., All-Ericsson, C., Economou, M.A., Aström, K., Axelson, M., Seregard, S., Larsson, O., and Girnita, L. (2006). The insulin-like growth factor-I receptor inhibitor picropodophyllin causes tumor regression and attenuates mechanisms involved in invasion of uveal melanoma cells. Clin. Cancer Res. *12*, 1383–1391.

Gödecke, A., Flögel, U., Zanger, K., Ding, Z., Hirchenhain, J., Decking, U.K.M., and Schrader, J. (1999). Disruption of myoglobin in mice induces multiple compensatory mechanisms. PNAS *96*, 10495–10500.

Golde, D.W., Bersch, N., and Cline, M.J. (1976). Potentiation of erythropoiesis in vitro by dexamethasone. J. Clin. Invest. *57*, 57–62.

Gonzalez, G.A., and Montminy, M.R. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. Cell *59*, 675–680.

Grass, J.A., Boyer, M.E., Pal, S., Wu, J., Weiss, M.J., and Bresnick, E.H. (2003). GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *100*, 8811–8816.

Greene, M.E., Mundschau, G., Wechsler, J., McDevitt, M., Gamis, A., Karp, J., Gurbuxani, S., Arceci, R., and Crispino, J.D. (2003). Mutations in GATA1 in both transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. Blood Cells Mol. Dis. *31*, 351–356.

Gregory, C.J., and Eaves, A.C. (1977). Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses. Blood *49*, 855–864.

Gregory, C.J., and Eaves, A.C. (1978). Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. Blood *51*, 527–537.

Gregory, G.D., Miccio, A., Bersenev, A., Wang, Y., Hong, W., Zhang, Z., Poncz, M., Tong, W., and Blobel, G.A. (2010). FOG1 requires NuRD to promote hematopoiesis and maintain lineage fidelity within the megakaryocytic-erythroid compartment. Blood *115*, 2156–2166.

Gregory, R.C., Taxman, D.J., Seshasayee, D., Kensinger, M.H., Bieker, J.J., and Wojchowski, D.M. (1996). Functional interaction of GATA1 with erythroid Krüppel-like factor and Sp1 at defined erythroid promoters. Blood *87*, 1793–1801.

Gregory, T., Yu, C., Ma, A., Orkin, S.H., Blobel, G.A., and Weiss, M.J. (1999). GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. Blood *94*, 87–96.

Gutiérrez, L., Nikolic, T., Van Dijk, T.B., Hammad, H., Vos, N., Willart, M., Grosveld, F., Philipsen, S., and Lambrecht, B.N. (2007). Gata1 regulates dendritic-cell development and survival. Blood *110*, 1933–1941.

Gutiérrez, L., Tsukamoto, S., Suzuki, M., Yamamoto-Mukai, H., Yamamoto, M., Philipsen, S., and Ohneda, K. (2008). Ablation of Gata1 in adult mice results in aplastic crisis, revealing its essential role in steady-state and stress erythropoiesis. Blood *111*, 4375–4385.

Halsey, C., Tunstall, O., Gibson, B., Roberts, I., and Graham, G. (2010). Role of GATA-1s in early hematopoiesis and differences between alternative splicing in human and murine GATA-1. Blood *115*, 3415–3416.

Harrison, D.E. (1975). Defective erythropoietic responses of aged mice not improved by young marrow. J Gerontol *30*, 286–288.

Hasegawa, A., Shimizu, R., Mohandas, N., and Yamamoto, M. (2012). Mature erythrocyte membrane homeostasis is compromised by loss of the GATA1-FOG1 interaction. Blood *119*, 2615–2623.

Haseyama, Y., Sawada, K. i, Oda, A., Koizumi, K., Takano, H., Tarumi, T., Nishio, M., Handa, M., Ikeda, Y., and Koike, T. (1999). Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in the protection of primary cultured human erythroid precursor cells from apoptosis. Blood *94*, 1568–1577.

Hassoun, H., Vassiliadis, J.N., Murray, J., Njolstad, P.R., Rogus, J.J., Ballas, S.K., Schaffer, F., Jarolim, P., Brabec, V., and Palek, J. (1997). Characterization of the underlying molecular defect in hereditary spherocytosis associated with spectrin deficiency. Blood *90*, 398–406.

Hermine, O., Mayeux, P., Titeux, M., Mitjavila, M.T., Casadevall, N., Guichard, J., Komatsu, N., Suda, T., Miura, Y., and Vainchenker, W. (1992). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and erythropoietin act competitively to induce two different programs of differentiation in the human pluripotent cell line UT-7. Blood *80*, 3060–3069.

Hofmann, F., and García-Echeverría, C. (2005). Blocking the insulin-like growth factor-I receptor as a strategy for targeting cancer. Drug Discov. Today *10*, 1041–1047.

Hollanda, L.M., Lima, C.S.P., Cunha, A.F., Albuquerque, D.M., Vassallo, J., Ozelo, M.C., Joazeiro, P.P., Saad, S.T.O., and Costa, F.F. (2006). An inherited mutation leading to production of only the short isoform of GATA-1 is associated with impaired erythropoiesis. Nat. Genet. *38*, 807–812.

Hong, W., Nakazawa, M., Chen, Y.-Y., Kori, R., Vakoc, C.R., Rakowski, C., and Blobel, G.A. (2005). FOG-1 recruits the NuRD repressor complex to mediate transcriptional repression by GATA-1. EMBO J. *24*, 2367–2378.

Hu, N., Gulley, M.L., Kung, J.T., and Lee, E.Y. (1997). Retinoblastoma gene deficiency has mitogenic but not tumorigenic effects on erythropoiesis. Cancer Res. *57*, 4123–4129.

Huddleston, H., Tan, B., Yang, F.-C., White, H., Wenning, M.J., Orazi, A., Yoder, M.C., Kapur, R., and Ingram, D.A. (2003). Functional p85alpha gene is required for normal murine fetal erythropoiesis. Blood *102*, 142–145.

Hung, H.L., Lau, J., Kim, A.Y., Weiss, M.J., and Blobel, G.A. (1999). CREB-Binding protein acetylates hematopoietic transcription factor GATA-1 at functionally important sites. Mol. Cell. Biol. *19*, 3496–3505.

Hunter, T., and Karin, M. (1992). The regulation of transcription by phosphorylation. Cell *70*, 375–387.

Hyde, B.B., Liesa, M., Elorza, A.A., Qiu, W., Haigh, S.E., Richey, L., Mikkola, H.K., Schlaeger, T.M., and Shirihai, O.S. (2012). The mitochondrial transporter ABC-me (ABCB10), a downstream target of GATA-1, is essential for erythropoiesis in vivo. Cell Death Differ. *19*, 1117–1126.

Iavarone, A., King, E.R., Dai, X.-M., Leone, G., Stanley, E.R., and Lasorella, A. (2004). Retinoblastoma promotes definitive erythropoiesis by repressing Id2 in fetal liver macrophages. Nature *432*, 1040–1045.

Imanishi, M., Imamura, C., Higashi, C., Yan, W., Negi, S., Futaki, S., and Sugiura, Y. (2010). Zinc finger–zinc finger interaction between the transcription factors, GATA-1 and Sp1. Biochemical and Biophysical Research Communications *400*, 625–630.

Ito, E., Toki, T., Ishihara, H., Ohtani, H., Gu, L., Yokoyama, M., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (1993). Erythroid transcription factor GATA-1 is abundantly transcribed in mouse testis. Nature *362*, 466–468.

Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E.M., Bronson, R.T., Goodell, M.A., and Weinberg, R.A. (1992). Effects of an Rb mutation in the mouse. Nature *359*, 295–300.

Jackson, S.P. (1992). Regulating transcription factor activity by phosphorylation. Trends Cell Biol. *2*, 104–108.

James, C., Ugo, V., Le Couédic, J.-P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garçon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., et al. (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature *434*, 1144–1148.

Jarolim, P., Murray, J.L., Rubin, H.L., Taylor, W.M., Prchal, J.T., Ballas, S.K., Snyder, L.M., Chrobak, L., Melrose, W.D., Brabec, V., et al. (1996). Characterization of 13 novel band 3 gene defects in hereditary spherocytosis with band 3 deficiency. Blood *88*, 4366–4374.

Jewell, U.R., Kvietikova, I., Scheid, A., Bauer, C., Wenger, R.H., and Gassmann, M. (2001). Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. FASEB J. *15*, 1312–1314.

Johnson, K.D., Kim, S.-I., and Bresnick, E.H. (2006). Differential sensitivities of transcription factor target genes underlie cell type-specific gene expression profiles. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *103*, 15939–15944.

Johnson, K.D., Boyer, M.E., Kang, J.-A., Wickrema, A., Cantor, A.B., and Bresnick, E.H. (2007). Friend of GATA-1-independent transcriptional repression: a novel mode of GATA-1 function. Blood *109*, 5230–5233.

Kadri, Z., Maouche-Chretien, L., Rooke, H.M., Orkin, S.H., Romeo, P.-H., Mayeux, P., Leboulch, P., and Chretien, S. (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt induced by erythropoietin renders the erythroid differentiation factor GATA-1 competent for TIMP-1 gene transactivation. Mol. Cell. Biol. *25*, 7412–7422.

Kadri, Z., Shimizu, R., Ohneda, O., Maouche-Chretien, L., Gisselbrecht, S., Yamamoto, M., Romeo, P.-H., Leboulch, P., and Chretien, S. (2009). Direct Binding of pRb/E2F-2 to GATA-1 Regulates Maturation and Terminal Cell Division during Erythropoiesis. PLoS Biol *7*, e1000123.

Kaneko, H., Shimizu, R., and Yamamoto, M. (2010). GATA factor switching during erythroid differentiation. Curr. Opin. Hematol. *17*, 163–168.

Kaneko, H., Kobayashi, E., Yamamoto, M., and Shimizu, R. (2012). N- and C-terminal transactivation domains of GATA1 protein coordinate hematopoietic program. J. Biol. Chem. *287*, 21439–21449.

Kapur, R., and Zhang, L. (2001). A novel mechanism of cooperation between c-Kit and erythropoietin receptor. Stem cell factor induces the expression of Stat5 and erythropoietin receptor, resulting in efficient proliferation and survival by erythropoietin. J. Biol. Chem. *276*, 1099–1106.

Kashii, Y., Uchida, M., Kirito, K., Tanaka, M., Nishijima, K., Toshima, M., Ando, T., Koizumi, K., Endoh, T., Sawada, K., et al. (2000). A member of Forkhead family transcription factor, FKHRL1, is one of the downstream molecules of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt activation pathway in erythropoietin signal transduction. Blood *96*, 941–949.

Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S.W., Ewen, M.E., and Sherr, C.J. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. Genes Dev. *7*, 331–342.

Kawabata, H., Yang, R., Hirama, T., Vuong, P.T., Kawano, S., Gombart, A.F., and Koeffler, H.P. (1999). Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. J. Biol. Chem. *274*, 20826–20832.

Kim, S.-I., and Bresnick, E.H. (2007). Transcriptional control of erythropoiesis: emerging mechanisms and principles. Oncogene *26*, 6777–6794.

Kina, T., Ikuta, K., Takayama, E., Wada, K., Majumdar, A.S., Weissman, I.L., and Katsura, Y. (2000). The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage. Br. J. Haematol. *109*, 280–287.

Klusmann, J.-H., Godinho, F.J., Heitmann, K., Maroz, A., Koch, M.L., Reinhardt, D., Orkin, S.H., and Li, Z. (2010). Developmental stage-specific interplay of GATA1 and IGF signaling in fetal megakaryopoiesis and leukemogenesis. Genes Dev. *24*, 1659–1672.

Komatsu, N., Nakauchi, H., Miwa, A., Ishihara, T., Eguchi, M., Moroi, M., Okada, M., Sato, Y., Wada, H., and Yawata, Y. (1991). Establishment and characterization of a human leukemic cell line with megakaryocytic features: dependency on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin 3, or erythropoietin for growth and survival. Cancer Res. *51*, 341–348.

Komatsu, N., Yamamoto, M., Fujita, H., Miwa, A., Hatake, K., Endo, T., Okano, H., Katsube, T., Fukumaki, Y., and Sassa, S. (1993). Establishment and characterization of an erythropoietin-dependent subline, UT-7/Epo, derived from human leukemia cell line, UT-7. Blood *82*, 456–464.

Koury, M.J., Bondurant, M.C., Graber, S.E., and Sawyer, S.T. (1988). Erythropoietin messenger RNA levels in developing mice and transfer of 125I-erythropoietin by the placenta. J. Clin. Invest. *82*, 154–159.

Kowalski, K., Czolij, R., King, G.F., Crossley, M., and Mackay, J.P. (1999). The solution structure of the N-terminal zinc finger of GATA-1 reveals a specific binding face for the transcriptional co-factor FOG. J. Biomol. NMR *13*, 249–262.

Kramer, M.F., Gunaratne, P., and Ferreira, G.C. (2000). Transcriptional regulation of the murine erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase gene. Gene *247*, 153–166.

Kubota, Y., Ohnishi, H., Kitanaka, A., Ishida, T., and Tanaka, T. (2004). Constitutive activation of PI3K is involved in the spontaneous proliferation of primary acute myeloid leukemia cells: direct evidence of PI3K activation. Leukemia *18*, 1438–1440.

Kuypers, F.A., Yuan, J., Lewis, R.A., Snyder, L.M., Kiefer, C.R., Bunyaratvej, A., Fucharoen, S., Ma, L., Styles, L., De Jong, K., et al. (1998). Membrane phospholipid asymmetry in human thalassemia. Blood *91*, 3044–3051.

Lamonica, J.M., Vakoc, C.R., and Blobel, G.A. (2006). Acetylation of GATA-1 is required for chromatin occupancy. Blood *108*, 3736–3738.

Lee, E.Y., Chang, C.Y., Hu, N., Wang, Y.C., Lai, C.C., Herrup, K., Lee, W.H., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. Nature *359*, 288–294.

Lee, H.-Y., Johnson, K.D., Fujiwara, T., Boyer, M.E., Kim, S.-I., and Bresnick, E.H. (2009). Controlling hematopoiesis through sumoylation-dependent regulation of a GATA factor. Mol. Cell *36*, 984–995.

Lenox, L.E., Perry, J.M., and Paulson, R.F. (2005). BMP4 and Madh5 regulate the erythroid response to acute anemia. Blood *105*, 2741–2748.

Lenox, L.E., Shi, L., Hegde, S., and Paulson, R.F. (2009). Extramedullary erythropoiesis in the adult liver requires BMP-4/Smad5-dependent signaling. Exp. Hematol. *37*, 549–558.

Leonard, M., Brice, M., Engel, J.D., and Papayannopoulou, T. (1993). Dynamics of GATA transcription factor expression during erythroid differentiation. Blood *82*, 1071–1079.

Letting, D.L., Chen, Y.-Y., Rakowski, C., Reedy, S., and Blobel, G.A. (2004). Context-dependent regulation of GATA-1 by friend of GATA-1. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *101*, 476–481.

Levy, J.E., Jin, O., Fujiwara, Y., Kuo, F., and Andrews, N.C. (1999). Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. Nat. Genet. *21*, 396–399.

Lew, V.L., and Bookchin, R.M. (2005). Ion transport pathology in the mechanism of sickle cell dehydration. Physiol. Rev. *85*, 179–200.

Li, K., Menon, M.P., Karur, V.G., Hegde, S., and Wojchowski, D.M. (2003). Attenuated signaling by a phosphotyrosine-null Epo receptor form in primary erythroid progenitor cells. Blood *102*, 3147–3153.

Li, W., Wu, C.-L., Febbo, P.G., and Olumi, A.F. (2007). Stromally expressed c-Jun regulates proliferation of prostate epithelial cells. Am. J. Pathol. *171*, 1189–1198.

Li, Z., Godinho, F.J., Klusmann, J.-H., Garriga-Canut, M., Yu, C., and Orkin, S.H. (2005). Developmental stage-selective effect of somatically mutated leukemogenic transcription factor GATA1. Nat. Genet. *37*, 613–619.

Liao, W., Nguyen, M.T.A., Yoshizaki, T., Favelyukis, S., Patsouris, D., Imamura, T., Verma, I.M., and Olefsky, J.M. (2007). Suppression of PPAR-gamma attenuates insulin-stimulated glucose uptake by affecting both GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *293*, E219–227.

Liew, C.K., Simpson, R.J.Y., Kwan, A.H.Y., Crofts, L.A., Loughlin, F.E., Matthews, J.M., Crossley, M., and Mackay, J.P. (2005). Zinc fingers as protein recognition motifs: structural basis for the GATA-1/friend of GATA interaction. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *102*, 583–588.

Von Lindern, M., Zauner, W., Mellitzer, G., Steinlein, P., Fritsch, G., Huber, K., Löwenberg, B., and Beug, H. (1999). The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-Kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors in vitro. Blood *94*, 550–559.

Lipinski, M.M., Macleod, K.F., Williams, B.O., Mullaney, T.L., Crowley, D., and Jacks, T. (2001). Cell-autonomous and non-cell-autonomous functions of the Rb tumor suppressor in developing central nervous system. EMBO J. *20*, 3402–3413.

Liu, S.C., and Palek, J. (1980). Spectrin tetramer-dimer equilibrium and the stability of erythrocyte membrane skeletons. Nature *285*, 586–588.

Liu, J., Mohandas, N., and An, X. (2011). Membrane assembly during erythropoiesis. Curr. Opin. Hematol. *18*, 133–138.

Liu, J.P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). Cell *75*, 59–72.

Low, P.S., Waugh, S.M., Zinke, K., and Drenckhahn, D. (1985). The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. Science *227*, 531–533.

Maandag, E.C., Van der Valk, M., Vlaar, M., Feltkamp, C., O'Brien, J., Van Roon, M., Van der Lugt, N., Berns, A., and Te Riele, H. (1994). Developmental rescue of an embryonic-lethal mutation in the retinoblastoma gene in chimeric mice. EMBO J. *13*, 4260–4268.

Mackay, J.P., Kowalski, K., Fox, A.H., Czolij, R., King, G.F., and Crossley, M. (1998). Involvement of the N-finger in the self-association of GATA-1. J. Biol. Chem. *273*, 30560–30567.

Macleod, K.F. (2008). The role of the RB tumour suppressor pathway in oxidative stress responses in the haematopoietic system. Nat. Rev. Cancer *8*, 769–781.

Mairet-Coello, G., Tury, A., and DiCicco-Bloom, E. (2009). Insulin-like growth factor-1 promotes G(1)/S cell cycle progression through bidirectional regulation of cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in developing rat cerebral cortex. J. Neurosci. *29*, 775–788.

Manno, S., Takakuwa, Y., and Mohandas, N. (2002). Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *99*, 1943–1948.

Maouche, L., Cartron, J.P., and Chretien, S. (1994). Different domains regulate the human erythropoietin receptor gene transcription. Nucleic Acids Res. *22*, 338–346.

Marchesi, S.L., Conboy, J., Agre, P., Letsinger, J.T., Marchesi, V.T., Speicher, D.W., and Mohandas, N. (1990). Molecular analysis of insertion/deletion mutations in protein 4.1 in elliptocytosis. I. Biochemical identification of rearrangements in the spectrin/actin binding domain and functional characterizations. J. Clin. Invest. *86*, 516–523.

Martelli, A.M., Nyåkern, M., Tabellini, G., Bortul, R., Tazzari, P.L., Evangelisti, C., and Cocco, L. (2006). Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. Leukemia *20*, 911–928.

Martin, D.I., and Orkin, S.H. (1990). Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. Genes Dev. *4*, 1886–1898.

Martin, D.I., Zon, L.I., Mutter, G., and Orkin, S.H. (1990). Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. Nature *344*, 444–447.

Mayeux, P., Casadevall, N., Lacombe, C., Muller, O., and Tambourin, P. (1990). Solubilization and hydrodynamic characteristics of the erythropoietin receptor. Evidence for a multimeric complex. Eur. J. Biochem. *194*, 271–278.

Mayr, B., and Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *2*, 599–609.

McDevitt, M.A., Shivdasani, R.A., Fujiwara, Y., Yang, H., and Orkin, S.H. (1997). 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. *94*, 6781–6785.

McGrath, K., and Palis, J. (2008). Ontogeny of erythropoiesis in the mammalian embryo. Curr. Top. Dev. Biol. *82*, 1–22.

McNiece, I.K., Langley, K.E., and Zsebo, K.M. (1991). Recombinant human stem cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and epo to stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages. Exp. Hematol. *19*, 226–231.

Medvinsky, A., Rybtsov, S., and Taoudi, S. (2011). Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. Development *138*, 1017–1031.

Mehaffey, M.G., Newton, A.L., Gandhi, M.J., Crossley, M., and Drachman, J.G. (2001). X-linked thrombocytopenia caused by a novel mutation of GATA-1. Blood *98*, 2681–2688.

Meier, R., Alessi, D.R., Cron, P., Andjelković, M., and Hemmings, B.A. (1997). Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase Bbeta. J. Biol. Chem. *272*, 30491–30497.

Meijer, L. (2003). Le cycle de division cellulaire et sa régulation. Oncologie *5*, 311–326.

Merika, M., and Orkin, S.H. (1995). Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Krüppel family proteins Sp1 and EKLF. Mol. Cell. Biol. *15*, 2437–2447.

Migliaccio, A.R., Masselli, E., Varricchio, L., and Whitsett, C. (2012). Ex-vivo expansion of red blood cells: how real for transfusion in humans? Blood Rev. *26*, 81–95.

Milanick, M.A., and Hoffman, J.F. (1986). Ion transport and volume regulation in red blood cells. Ann. N. Y. Acad. Sci. *488*, 174–186.

Millot, S., Andrieu, V., Letteron, P., Lyoumi, S., Hurtado-Nedelec, M., Karim, Z., Thibaudeau, O., Bennada, S., Charrier, J.-L., Lasocki, S., et al. (2010). Erythropoietin stimulates spleen BMP4-dependent stress erythropoiesis and partially corrects anemia in a mouse model of generalized inflammation. Blood *116*, 6072–6081.

Mirza, A.M., Correa, P.N., and Axelrad, A.A. (1995). Increased basal and induced tyrosine phosphorylation of the insulin-like growth factor I receptor beta subunit in circulating mononuclear cells of patients with polycythemia vera. Blood *86*, 877–882.

Mirza, A.M., Ezzat, S., and Axelrad, A.A. (1997). Insulin-like growth factor binding protein-1 is elevated in patients with polycythemia vera and stimulates erythroid burst formation in vitro. Blood *89*, 1862–1869.

Missiroli, S., Etro, D., Buontempo, F., Ye, K., Capitani, S., and Neri, L.M. (2009). Nuclear translocation of active AKT is required for erythroid differentiation in erythropoietin treated K562 erythroleukemia cells. Int. J. Biochem. Cell Biol. *41*, 570–577.

Miyagawa, S., Kobayashi, M., Konishi, N., Sato, T., and Ueda, K. (2000). Insulin and insulin-like growth factor I support the proliferation of erythroid progenitor cells in bone marrow through the sharing of receptors. Br. J. Haematol. *109*, 555–562.

Miyake, T., Kung, C.K., and Goldwasser, E. (1977). Purification of human erythropoietin. J. Biol. Chem. *252*, 5558–5564.

Mohandas, N., and Chasis, J.A. (1993). Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. Semin. Hematol. *30*, 171–192.

Mohandas, N., and Gallagher, P.G. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. Blood *112*, 3939–3948.

Molkentin, J.D. (2000). The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. J. Biol. Chem. *275*, 38949–38952.

Montel-Hagen, A., Blanc, L., Boyer-Clavel, M., Jacquet, C., Vidal, M., Sitbon, M., and Taylor, N. (2008). The Glut1 and Glut4 glucose transporters are differentially expressed during perinatal and postnatal erythropoiesis. Blood *112*, 4729–4738.

Morris, E.J., and Dyson, N.J. (2001). Retinoblastoma protein partners. Adv. Cancer Res. *82*, 1–54.

Mudaliar, S., and Henry, R.R. (2001). New oral therapies for type 2 diabetes mellitus: The glitazones or insulin sensitizers. Annu. Rev. Med. *52*, 239–257.

Mukherjee, R., Hoener, P.A., Jow, L., Bilakovics, J., Klausing, K., Mais, D.E., Faulkner, A., Croston, G.E., and Paterniti, J.R., Jr (2000). A selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) modulator blocks adipocyte differentiation but stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. Mol. Endocrinol. *14*, 1425–1433.

Muntean, A.G., and Crispino, J.D. (2005). Differential requirements for the activation domain and FOG-interaction surface of GATA-1 in megakaryocyte gene expression and development. Blood *106*, 1223–1231.

Munugalavadla, V., Dore, L.C., Tan, B.L., Hong, L., Vishnu, M., Weiss, M.J., and Kapur, R. (2005). Repression of c-Kit and Its Downstream Substrates by GATA-1 Inhibits Cell Proliferation during Erythroid Maturation. Mol. Cell. Biol. *25*, 6747–6759.

Muta, K., Krantz, S.B., Bondurant, M.C., and Wickrema, A. (1994). Distinct roles of erythropoietin, insulin-like growth factor I, and stem cell factor in the development of erythroid progenitor cells. J. Clin. Invest. *94*, 34–43.

Muta, K., Krantz, S.B., Bondurant, M.C., and Dai, C.H. (1995). Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation. Blood *86*, 572–580.

Myklebust, J.H., Blomhoff, H.K., Rusten, L.S., Stokke, T., and Smeland, E.B. (2002). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is important for erythropoietin-induced erythropoiesis from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. Exp. Hematol. *30*, 990–1000.

Nerlov, C., Querfurth, E., Kulessa, H., and Graf, T. (2000). GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. Blood *95*, 2543–2551.

Nichols, K.E., Crispino, J.D., Poncz, M., White, J.G., Orkin, S.H., Maris, J.M., and Weiss, M.J. (2000). Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. Nat. Genet. *24*, 266–270.

Nicholson, K.M., and Anderson, N.G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. Cell. Signal. *14*, 381–395.

Nilson, D.G., Sabatino, D.E., Bodine, D.M., and Gallagher, P.G. (2006). Major erythrocyte membrane protein genes in EKLF-deficient mice. Exp. Hematol. *34*, 705–712.

Nilsson-Ehle, H., Bengtsson, B.-A., Lindstedt, G., and Mellström, D. (2005). Insulin-like growth factor-1 is a predictor of blood haemoglobin concentration in 70-yr-old subjects. Eur. J. Haematol. *74*, 111–116.

Nuez, B., Michalovich, D., Bygrave, A., Ploemacher, R., and Grosveld, F. (1995). Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. Nature *375*, 316–318.

Ohneda, K., and Yamamoto, M. (2002). Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage. Acta Haematol. *108*, 237–245.

Ohneda, K., Shimizu, R., Nishimura, S., Muraosa, Y., Takahashi, S., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (2002). A minigene containing four discrete cis elements recapitulates GATA-1 gene expression in vivo. Genes Cells *7*, 1243–1254.

Olianas, M.C., Dedoni, S., and Onali, P. (2011). δ-Opioid receptors stimulate GLUT1-mediated glucose uptake through Src- and IGF-1 receptor-dependent activation of PI3-kinase signalling in CHO cells. Br J Pharmacol *163*, 624–637.

Onodera, K., Takahashi, S., Nishimura, S., Ohta, J., Motohashi, H., Yomogida, K., Hayashi, N., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (1997). GATA-1 transcription is controlled by distinct regulatory mechanisms during primitive and definitive erythropoiesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *94*, 4487–4492.

Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. Cell *132*, 631–644.

Ouyang, L., Chen, X., and Bieker, J.J. (1998). Regulation of erythroid Krüppel-like factor (EKLF) transcriptional activity by phosphorylation of a protein kinase casein kinase II site within its interaction domain. J. Biol. Chem. *273*, 23019–23025.

Pal, S., Cantor, A.B., Johnson, K.D., Moran, T.B., Boyer, M.E., Orkin, S.H., and Bresnick, E.H. (2004). Coregulator-dependent facilitation of chromatin occupancy by GATA-1. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *101*, 980–985.

Papetti, M., Wontakal, S.N., Stopka, T., and Skoultchi, A.I. (2010). GATA-1 directly regulates p21 gene expression during erythroid differentiation. Cell Cycle *9*, 1972–1980.

Park, J.B. (1999). Flavonoids are potential inhibitors of glucose uptake in U937 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *260*, 568–574.

Partington, G.A., and Patient, R.K. (1999). Phosphorylation of GATA-1 increases its DNA-binding affinity and is correlated with induction of human K562 erythroleukaemia cells. Nucleic Acids Res. *27*, 1168–1175.

Paulson, R.F., Shi, L., and Wu, D.-C. (2011). Stress erythropoiesis: new signals and new stress progenitor cells. Curr Opin Hematol *18*, 139–145.

Perry, J.M., Harandi, O.F., and Paulson, R.F. (2007). BMP4, SCF, and hypoxia cooperatively regulate the expansion of murine stress erythroid progenitors. Blood *109*, 4494–4502.

Perry, J.M., Harandi, O.F., Porayette, P., Hegde, S., Kannan, A.K., and Paulson, R.F. (2009). Maintenance of the BMP4-dependent stress erythropoiesis pathway in the murine spleen requires hedgehog signaling. Blood *113*, 911–918.

Pevny, L., Simon, M.C., Robertson, E., Klein, W.H., Tsai, S.F., D'Agati, V., Orkin, S.H., and Costantini, F. (1991). Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. Nature *349*, 257–260.

Pevny, L., Lin, C.S., D'Agati, V., Simon, M.C., Orkin, S.H., and Costantini, F. (1995). Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. Development *121*, 163–172.

Picard, F., and Auwerx, J. (2002). PPAR(gamma) and glucose homeostasis. Annu. Rev. Nutr. *22*, 167–197.

Piekorz, R.P., Hoffmeyer, A., Duntsch, C.D., McKay, C., Nakajima, H., Sexl, V., Snyder, L., Rehg, J., and Ihle, J.N. (2002). The centrosomal protein TACC3 is essential for hematopoietic stem cell function and genetically interfaces with p53-regulated apoptosis. EMBO J. *21*, 653–664.

Pilon, A.M., Arcasoy, M.O., Dressman, H.K., Vayda, S.E., Maksimova, Y.D., Sangerman, J.I., Gallagher, P.G., and Bodine, D.M. (2008). Failure of terminal erythroid differentiation in EKLF-deficient mice is associated with cell cycle perturbation and reduced expression of E2F2. Mol. Cell. Biol. *28*, 7394–7401.

Plas, D.R., and Thompson, C.B. (2003). Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. J. Biol. Chem. *278*, 12361–12366.

Polak, R., and Buitenhuis, M. (2012). The PI3K/PKB signaling module as key regulator of hematopoiesis: implications for therapeutic strategies in leukemia. Blood *119*, 911–923.

Polychronakos, C., Guyda, H.J., and Posner, B.I. (1983). Receptors for the insulin-like growth factors on human erythrocytes. J. Clin. Endocrinol. Metab. *57*, 436–438.

Porayette, P., and Paulson, R.F. (2008). BMP4/Smad5 dependent stress erythropoiesis is required for the expansion of erythroid progenitors during fetal development. Dev. Biol. *317*, 24–35.

Rahuel, C., Vinit, M.A., Lemarchandel, V., Cartron, J.P., and Roméo, P.H. (1992). Erythroid-specific activity of the glycophorin B promoter requires GATA-1 mediated displacement of a repressor. EMBO J. *11*, 4095–4102.

Rainis, L., Bercovich, D., Strehl, S., Teigler-Schlegel, A., Stark, B., Trka, J., Amariglio, N., Biondi, A., Muler, I., Rechavi, G., et al. (2003). Mutations in exon 2 of GATA1 are early events in megakaryocytic malignancies associated with trisomy 21. Blood *102*, 981–986.

Ratajczak, J., Zhang, Q., Pertusini, E., Wojczyk, B.S., Wasik, M.A., and Ratajczak, M.Z. (1998). The role of insulin (INS) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) in regulating human erythropoiesis. Studies in vitro under serum-free conditions--comparison to other cytokines and growth factors. Leukemia *12*, 371–381.

Reid, M.E., and Mohandas, N. (2004). Red blood cell blood group antigens: structure and function. Semin. Hematol. *41*, 93–117.

Rekhtman, N., Radparvar, F., Evans, T., and Skoultchi, A.I. (1999). Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. Genes Dev. *13*, 1398–1411.

Richmond, T.D., Chohan, M., and Barber, D.L. (2005). Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. Trends Cell Biol. *15*, 146–155.

Ringshausen, I., Schneller, F., Bogner, C., Hipp, S., Duyster, J., Peschel, C., and Decker, T. (2002). Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta. Blood *100*, 3741–3748.

Rodriguez, P., Bonte, E., Krijgsveld, J., Kolodziej, K.E., Guyot, B., Heck, A.J.R., Vyas, P., De Boer, E., Grosveld, F., and Strouboulis, J. (2005). GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. EMBO J. *24*, 2354–2366.

Le Roith, D., Scavo, L., and Butler, A. (2001). What is the role of circulating IGF-I? Trends Endocrinol. Metab. *12*, 48–52.

Romeo, P.H., Prandini, M.H., Joulin, V., Mignotte, V., Prenant, M., Vainchenker, W., Marguerie, G., and Uzan, G. (1990). Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. Nature *344*, 447–449.

Rooke, H.M., and Orkin, S.H. (2006). Phosphorylation of Gata1 at serine residues 72, 142, and 310 is not essential for hematopoiesis in vivo. Blood *107*, 3527–3530.

Ruiz-Torres, A., and Soares de Melo Kirzner, M. (2002). Ageing and longevity are related to growth hormone/insulin-like growth factor-1 secretion. Gerontology *48*, 401–407.

Russo, A.A., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (1996). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. Nat. Struct. Biol. *3*, 696–700.

Rylski, M., Welch, J.J., Chen, Y.-Y., Letting, D.L., Diehl, J.A., Chodosh, L.A., Blobel, G.A., and Weiss, M.J. (2003). GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation. Mol. Cell. Biol. *23*, 5031–5042.

Salomao, M., Zhang, X., Yang, Y., Lee, S., Hartwig, J.H., Chasis, J.A., Mohandas, N., and An, X. (2008). Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: new insights into the structural organization of the red blood cell membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *105*, 8026–8031.

Sankaran, V.G., Orkin, S.H., and Walkley, C.R. (2008). Rb intrinsically promotes erythropoiesis by coupling cell cycle exit with mitochondrial biogenesis. Genes Dev. *22*, 463–475.

Sankaran, V.G., Ghazvinian, R., Do, R., Thiru, P., Vergilio, J.-A., Beggs, A.H., Sieff, C.A., Orkin, S.H., Nathan, D.G., Lander, E.S., et al. (2012a). Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. J. Clin. Invest. *122*, 2439–2443.

Sankaran, V.G., Ludwig, L.S., Sicinska, E., Xu, J., Bauer, D.E., Eng, J.C., Patterson, H.C., Metcalf, R.A., Natkunam, Y., Orkin, S.H., et al. (2012b). Cyclin D3 coordinates the cell cycle during differentiation to regulate erythrocyte size and number. Genes Dev. *26*, 2075–2087.

Sato, T., Watanabe, S., Ishii, E., Tsuji, K., and Nakahata, T. (1998). 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. *273*, 16921–16926.

Sawada, K., Krantz, S.B., Dessypris, E.N., Koury, S.T., and Sawyer, S.T. (1989). Human colony-forming units-erythroid do not require accessory cells, but do require direct interaction with insulin-like growth factor I and/or insulin for erythroid development. J. Clin. Invest. *83*, 1701–1709.

Sherr, C.J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. Cancer Cell *2*, 103–112.

Shide, K., Shimoda, H.K., Kumano, T., Karube, K., Kameda, T., Takenaka, K., Oku, S., Abe, H., Katayose, K.S., Kubuki, Y., et al. (2008). Development of ET, primary myelofibrosis and PV in mice expressing JAK2 V617F. Leukemia *22*, 87–95.

Shimizu, R., Takahashi, S., Ohneda, K., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (2001). In vivo requirements for GATA-1 functional domains during primitive and definitive erythropoiesis. EMBO J. *20*, 5250–5260.

Shimizu, R., Ohneda, K., Engel, J.D., Trainor, C.D., and Yamamoto, M. (2004). Transgenic rescue of GATA-1-deficient mice with GATA-1 lacking a FOG-1 association site phenocopies patients with X-linked thrombocytopenia. Blood *103*, 2560–2567.

Shirihai, O.S., Gregory, T., Yu, C., Orkin, S.H., and Weiss, M.J. (2000). ABC-me: a novel mitochondrial transporter induced by GATA-1 during erythroid differentiation. EMBO J. *19*, 2492–2502.

Silva, A., Yunes, J.A., Cardoso, B.A., Martins, L.R., Jotta, P.Y., Abecasis, M., Nowill, A.E., Leslie, N.R., Cardoso, A.A., and Barata, J.T. (2008). PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. J. Clin. Invest. *118*, 3762–3774.

Singer, J.W., and Adamson, J.W. (1976). Steroids and hematopoiesis. III. The response of granulocytic and erythroid colony-forming cells to steroids of different classes. Blood *48*, 855–864.

Sivertsen, E.A., Hystad, M.E., Gutzkow, K.B., Døsen, G., Smeland, E.B., Blomhoff, H.K., and Myklebust, J.H. (2006). PI3K/Akt-dependent Epo-induced signalling and target genes in human early erythroid progenitor cells. Br. J. Haematol. *135*, 117–128.

Socolovsky, M., Nam, H., Fleming, M.D., Haase, V.H., Brugnara, C., and Lodish, H.F. (2001). Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. Blood *98*, 3261–3273.

Somervaille, T.C., Linch, D.C., and Khwaja, A. (2001). Growth factor withdrawal from primary human erythroid progenitors induces apoptosis through a pathway involving glycogen synthase kinase-3 and Bax. Blood *98*, 1374–1381.

Spike, B.T., Dirlam, A., Dibling, B.C., Marvin, J., Williams, B.O., Jacks, T., and Macleod, K.F. (2004). The Rb tumor suppressor is required for stress erythropoiesis. EMBO J. *23*, 4319–4329.

Spivak, J.L. (2005). The anaemia of cancer: death by a thousand cuts. Nat. Rev. Cancer *5*, 543–555.

Steiner, L.A., Maksimova, Y., Schulz, V., Wong, C., Raha, D., Mahajan, M.C., Weissman, S.M., and Gallagher, P.G. (2009). Chromatin architecture and transcription factor binding regulate expression of erythrocyte membrane protein genes. Mol. Cell. Biol. *29*, 5399–5412.

Strömberg, T., Ekman, S., Girnita, L., Dimberg, L.Y., Larsson, O., Axelson, M., Lennartsson, J., Hellman, U., Carlson, K., Osterborg, A., et al. (2006). IGF-1 receptor tyrosine kinase inhibition by the cyclolignan PPP induces G2/M-phase accumulation and apoptosis in multiple myeloma cells. Blood *107*, 669–678.

Succurro, E., Arturi, F., Caruso, V., Rudi, S., Sciacqua, A., Andreozzi, F., Hribal, M.L., Perticone, F., and Sesti, G. (2011). Low insulin-like growth factor-1 levels are associated with anaemia in adult non-diabetic subjects. Thromb. Haemost. *105*, 365–370.

Sudo, K., Ema, H., Morita, Y., and Nakauchi, H. (2000). Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. J. Exp. Med. *192*, 1273–1280.

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

Suzuki, M., Shimizu, R., and Yamamoto, M. (2011). Transcriptional regulation by GATA1 and GATA2 during erythropoiesis. Int. J. Hematol. *93*, 150–155.

Svensson, E.C., Tufts, R.L., Polk, C.E., and Leiden, J.M. (1999). Molecular cloning of FOG-2: a modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *96*, 956–961.

Takahashi, S., Onodera, K., Motohashi, H., Suwabe, N., Hayashi, N., Yanai, N., Nabesima, Y., and Yamamoto, M. (1997). Arrest in primitive erythroid cell development caused by promoter-specific disruption of the GATA-1 gene. J. Biol. Chem. *272*, 12611–12615.

Takahashi, S., Shimizu, R., Suwabe, N., Kuroha, T., Yoh, K., Ohta, J., Nishimura, S., Lim, K.C., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (2000). GATA factor transgenes under GATA-1 locus control rescue germline GATA-1 mutant deficiencies. Blood *96*, 910–916.

Tallack, M.R., and Perkins, A.C. (2010). KLF1 directly coordinates almost all aspects of terminal erythroid differentiation. IUBMB Life *62*, 886–890.

Tallack, M.R., Keys, J.R., Humbert, P.O., and Perkins, A.C. (2009). EKLF/KLF1 controls cell cycle entry via direct regulation of E2f2. J. Biol. Chem. *284*, 20966–20974.

Tan, B.L., Hong, L., Munugalavadla, V., and Kapur, R. (2003). Functional and biochemical consequences of abrogating the activation of multiple diverse early signaling pathways in Kit. Role for Src kinase pathway in Kit-induced cooperation with erythropoietin receptor. J. Biol. Chem. *278*, 11686–11695.

Taxman, D.J., Sonsteby, S.K., and Wojchowski, D.M. (1994). In vitro transcription of erythroid promoters using baculoviral-expressed human GATA-1: purification, physicochemistry, and activities. Protein Expr. Purif. *5*, 587–594.

Teng, R., Gavrilova, O., Suzuki, N., Chanturiya, T., Schimel, D., Hugendubler, L., Mammen, S., Yver, D.R., Cushman, S.W., Mueller, E., et al. (2011). Disrupted erythropoietin signalling promotes obesity and alters hypothalamus proopiomelanocortin production. Nat Commun *2*, 520.

Tevosian, S.G., Deconinck, A.E., Cantor, A.B., Rieff, H.I., Fujiwara, Y., Corfas, G., and Orkin, S.H. (1999). FOG-2: A novel GATA-family cofactor related to multitype zinc-finger proteins Friend of GATA-1 and U-shaped. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *96*, 950–955.

Thompson, J.E., and Thompson, C.B. (2004). Putting the rap on Akt. J. Clin. Oncol. *22*, 4217–4226.

Tjandra, N., Omichinski, J.G., Gronenborn, A.M., Clore, G.M., and Bax, A. (1997). Use of dipolar 1H-15N and 1H-13C couplings in the structure determination of magnetically oriented macromolecules in solution. Nat. Struct. Biol. *4*, 732–738.

Towatari, M., Ciro, M., Ottolenghi, S., Tsuzuki, S., and Enver, T. (2004). Involvement of mitogen-activated protein kinase in the cytokine-regulated phosphorylation of transcription factor GATA-1. Hematol. J. *5*, 262–272.

Trainor, C.D., Mas, C., Archambault, P., Di Lello, P., and Omichinski, J.G. (2009). GATA-1 associates with and inhibits p53. Blood *114*, 165–173.

Trimborn, T., Gribnau, J., Grosveld, F., and Fraser, P. (1999). Mechanisms of developmental control of transcription in the murine alpha- and beta-globin loci. Genes Dev. *13*, 112–124.

Tsai, S.-F., Martin, D.I.K., Zon, L.I., D'Andrea, A.D., Wong, G.G., and Orkin, S.H. (1989). Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. , Published Online: 08 June 1989; | Doi:10.1038/339446a0 *339*, 446–451.

Tsang, A.P., Visvader, J.E., Turner, C.A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M.J., Crossley, M., and Orkin, S.H. (1997). FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. Cell *90*, 109–119.

Tsang, A.P., Fujiwara, Y., Hom, D.B., and Orkin, S.H. (1998). Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. Genes Dev. *12*, 1176–1188.

Uddin, S., Kottegoda, S., Stigger, D., Platanias, L.C., and Wickrema, A. (2000). Activation of the Akt/FKHRL1 pathway mediates the antiapoptotic effects of erythropoietin in primary human erythroid progenitors. Biochem. Biophys. Res. Commun. *275*, 16–19.

Udupa, K.B., Crabtree, H.M., and Lipschitz, D.A. (1986). In vitro culture of proerythroblasts: characterization of proliferative response to erythropoietin and steroids. Br. J. Haematol. *62*, 705–714.

Vanhaesebroeck, B., and Waterfield, M.D. (1999). Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. Exp. Cell Res. *253*, 239–254.

Del Vecchio, G.C., Giordani, L., De Santis, A., and De Mattia, D. (2005). Dyserythropoietic anemia and thrombocytopenia due to a novel mutation in GATA-1. Acta Haematol. *114*, 113–116.

Vicente, C., Conchillo, A., García-Sánchez, M.A., and Odero, M.D. (2012). The role of the GATA2 transcription factor in normal and malignant hematopoiesis. Crit. Rev. Oncol. Hematol. *82*, 1–17.

Wadman, I.A., Osada, H., Grütz, G.G., Agulnick, A.D., Westphal, H., Forster, A., and Rabbitts, T.H. (1997). The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. EMBO J. *16*, 3145–3157.

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

Wallace, D.F., Summerville, L., and Subramaniam, V.N. (2007). Targeted disruption of the hepatic transferrin receptor 2 gene in mice leads to iron overload. Gastroenterology *132*, 301–310.

Wang, L.G., Liu, X.M., Wikiel, H., and Bloch, A. (1995). Activation of casein kinase II in ML-1 human myeloblastic leukemia cells requires IGF-1 and transferrin. J. Leukoc. Biol. *57*, 332–334.

Weber, Y.G., Storch, A., Wuttke, T.V., Brockmann, K., Kempfle, J., Maljevic, S., Margari, L., Kamm, C., Schneider, S.A., Huber, S.M., et al. (2008). GLUT1 mutations are a cause of paroxysmal exertion-induced dyskinesias and induce hemolytic anemia by a cation leak. J. Clin. Invest. *118*, 2157–2168.

Wechsler, J., Greene, M., McDevitt, M.A., Anastasi, J., Karp, J.E., Le Beau, M.M., and Crispino, J.D. (2002). Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. Nat. Genet. *32*, 148–152.

Weiss, M.J., and Orkin, S.H. (1995a). GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. Exp. Hematol. *23*, 99–107.

Weiss, M.J., and Orkin, S.H. (1995b). Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *92*, 9623–9627.

Weiss, M.J., Keller, G., and Orkin, S.H. (1994). Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. Genes Dev. *8*, 1184–1197.

Weiss, M.J., Yu, C., and Orkin, S.H. (1997). Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line. Mol. Cell. Biol. *17*, 1642–1651.

Weiss, M.J., Mason, P.J., and Bessler, M. (2012). What's in a name? Journal of Clinical Investigation *122*, 2346–2349.

Welch, J.J., Watts, J.A., Vakoc, C.R., Yao, Y., Wang, H., Hardison, R.C., Blobel, G.A., Chodosh, L.A., and Weiss, M.J. (2004). Global regulation of erythroid gene expression by transcription factor GATA-1. Blood *104*, 3136–3147.

Wenzel, P.L., Wu, L., De Bruin, A., Chong, J.-L., Chen, W.-Y., Dureska, G., Sites, E., Pan, T., Sharma, A., Huang, K., et al. (2007). Rb is critical in a mammalian tissue stem cell population. Genes Dev. *21*, 85–97.

Whitmarsh, A.J., and Davis, R.J. (2000). Regulation of transcription factor function by phosphorylation. Cell. Mol. Life Sci. *57*, 1172–1183.

Whyatt, D., and Grosveld, F. (2002). Cell-nonautonomous function of the retinoblastoma tumour suppressor protein: new interpretations of old phenotypes. EMBO Rep. *3*, 130–135.

Williams, B.O., Schmitt, E.M., Remington, L., Bronson, R.T., Albert, D.M., Weinberg, R.A., and Jacks, T. (1994). Extensive contribution of Rb-deficient cells to adult chimeric mice with limited histopathological consequences. EMBO J. *13*, 4251–4259.

Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., and Lodish, H.F. (1995a). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. Cell *83*, 59–67.

Wu, H., Klingmüller, U., Besmer, P., and Lodish, H.F. (1995b). Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. Nature *377*, 242–246.

Wu, H., Klingmüller, U., Acurio, A., Hsiao, J.G., and Lodish, H.F. (1997). Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *94*, 1806–1810.

Wu, L., De Bruin, A., Saavedra, H.I., Starovic, M., Trimboli, A., Yang, Y., Opavska, J., Wilson, P., Thompson, J.C., Ostrowski, M.C., et al. (2003). Extra-embryonic function of Rb is essential for embryonic development and viability. Nature *421*, 942–947.

Xu, G., Nagano, M., Kanezaki, R., Toki, T., Hayashi, Y., Taketani, T., Taki, T., Mitui, T., Koike, K., Kato, K., et al. (2003). Frequent mutations in the GATA-1 gene in the transient myeloproliferative disorder of Down syndrome. Blood *102*, 2960–2968.

Yang, J., Cron, P., Good, V.M., Thompson, V., Hemmings, B.A., and Barford, D. (2002). Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. Nat. Struct. Biol. *9*, 940–944.

Yasin, Z., Witting, S., Palascak, M.B., Joiner, C.H., Rucknagel, D.L., and Franco, R.S. (2003). Phosphatidylserine externalization in sickle red blood cells: associations with cell age, density, and hemoglobin F. Blood *102*, 365–370.

Yin, S., Girnita, A., Strömberg, T., Khan, Z., Andersson, S., Zheng, H., Ericsson, C., Axelson, M., Nistér, M., Larsson, O., et al. (2010). Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor by picropodophyllin as a treatment option for glioblastoma. Neuro-oncology *12*, 19–27.

Yomogida, K., Ohtani, H., Harigae, H., Ito, E., Nishimune, Y., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (1994). Developmental stage- and spermatogenic cycle-specific expression of transcription factor GATA-1 in mouse Sertoli cells. Development *120*, 1759–1766.

Yu, L., Ji, W., Zhang, H., Renda, M.J., He, Y., Lin, S., Cheng, E., Chen, H., Krause, D.S., and Min, W. (2010). SENP1-mediated GATA1 deSUMOylation is critical for definitive erythropoiesis. J Exp Med *207*, 1183–1195.

Yu, Y.-L., Chiang, Y.-J., Chen, Y.-C., Papetti, M., Juo, C.-G., Skoultchi, A.I., and Yen, J.J.Y. (2005). MAPK-mediated phosphorylation of GATA-1 promotes Bcl-XL expression and cell survival. J. Biol. Chem. *280*, 29533–29542.

Zang, H., Sato, K., Nakajima, H., McKay, C., Ney, P.A., and Ihle, J.N. (2001). The distal region and receptor tyrosines of the Epo receptor are non-essential for in vivo erythropoiesis. EMBO J. *20*, 3156–3166.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). Cell *87*, 619–628.

Zhang, J., Socolovsky, M., Gross, A.W., and Lodish, H.F. (2003). Role of Ras signaling in erythroid differentiation of mouse fetal liver cells: functional analysis by a flow cytometry-based novel culture system. Blood *102*, 3938–3946.

Zhang, J., Lee, E.Y., Liu, Y., Berman, S.D., Lodish, H.F., and Lees, J.A. (2010). pRB and E2F4 play distinct cell-intrinsic roles in fetal erythropoiesis. Cell Cycle *9*, 371–376.

Zhang, P., Behre, G., Pan, J., Iwama, A., Wara-Aswapati, N., Radomska, H.S., Auron, P.E., Tenen, D.G., and Sun, Z. (1999). Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *96*, 8705–8710.

Zhang, P., Zhang, X., Iwama, A., Yu, C., Smith, K.A., Mueller, B.U., Narravula, S., Torbett, B.E., Orkin, S.H., and Tenen, D.G. (2000). PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. Blood *96*, 2641–2648.

Zhao, J. (2007). Sumoylation regulates diverse biological processes. Cell. Mol. Life Sci. *64*, 3017–3033.

Zhao, W., Kitidis, C., Fleming, M.D., Lodish, H.F., and Ghaffari, S. (2006). Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. Blood *107*, 907–915.

Zhou, B.P., and Hung, M.-C. (2002). Novel targets of Akt, p21(Cipl/WAF1), and MDM2. Semin. Oncol. *29*, 62–70.

Zon, L.I., Tsai, S.F., Burgess, S., Matsudaira, P., Bruns, G.A., and Orkin, S.H. (1990). The major human erythroid DNA-binding protein (GF-1): primary sequence and localization of the gene to the X chromosome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *87*, 668–672.

Zon, L.I., Youssoufian, H., Mather, C., Lodish, H.F., and Orkin, S.H. (1991). Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *88*, 10638–10641.

Zon, L.I., Yamaguchi, Y., Yee, K., Albee, E.A., Kimura, A., Bennett, J.C., Orkin, S.H., and Ackerman, S.J. (1993). Expression of mRNA for the GATA-binding proteins in human eosinophils and basophils: potential role in gene transcription. Blood *81*, 3234–3241.