Thèse de doctorat de l'Université de Paris

Ecole doctorale ED N°562 Bio Sorbonne Paris Cité

Laboratoire : UMRS_1134 Biologie intégrée du Globule Rouge

Identification de gènes candidats pour l'anémie de Blackfan-Diamond et caractérisation phénotypique

Présentée par

Manon Juliette SABY

Thèse de doctorat de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Physiologie, Physiopathologie

Dirigée par le Pr Lydie Da Costa

Présentée et soutenue publiquement le 16 Décembre 2019

A l'Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris, France

Devant un jury composé de :

Présidente : Pr Chantal Desdouet, Centre des Cordeliers
Rapporteur : Dr Michel Cohen-Tannoudji, Institut Pasteur
Rapporteur : Pr Loïc Garçon, CHU Amiens
Examinateur : Pr Patrick Mayeux, Institut Cochin
Examinatrice : Dr Sandrina Kinet, IGMM
Directrice de thèse : Pr Lydie Da Costa, INTS

« Pose ta question, tu seras idiot une seconde.
Ne la pose pas, tu seras idiot toute ta vie. »

Albert Einstein

« On doit exiger que je cherche la vérité,
non que je la trouve »

Denis Diderot

REMERCIEMENTS

Telle une épreuve sportive, réaliser une thèse est une décision personnelle dont la médaille nous revient, et pourtant, plus d'une personne est engagée dans ce projet. Sans la présence d'une équipe de confiance, cette étape n'aurait pas pu être possible. Il est donc tout naturel que je prenne le temps de penser et de remercier celles et ceux qui ont participé à la concrétisation de ce projet.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury pour avoir accepté de juger mon travail de thèse. Je remercie le Docteur Michel Cohen Tannoudji et le Professeur Loïc Garçon d'avoir accepté d'être mes rapporteurs et d'avoir étudié avec attention ma thèse. Je vous remercie pour vos suggestions de correction qui ont rendu mon manuscrit bien meilleur.
Je remercie le Dr Sandrina Kinet et le Professeur Patrick Mayeux d'avoir accepté le rôle d'examinateur.
Je voudrais également remercier le Dr Chantal Desdouet pour la présidence de mon jury et le temps que vous m'avez accordé au cours de ces derniers mois de thèse. Votre aide a été pour moi inestimable.

Merci à ma directrice de thèse, le Professeur Lydie Da Costa pour le sujet passionnant qui m'a été proposé d'étudier, sans quoi ma thèse aurait été entièrement différente.

Je souhaite remercier le Dr Yves Colin de m'avoir acceptée au sein de son unité et de m'avoir permis de réaliser ces travaux. Merci de m'avoir permis d'entrée dans ce merveilleux monde qu'est le globule rouge. Merci pour votre soutien et toute l'aide que vous m'avez apportée. Merci également au Professeur Caroline Le Van Kim pour m'avoir permis d'évoluer au sein de son équipe.

Je tiens tout particulièrement à remercier les filles de l'équipe 4 : Aurélie, Charlotte et Mallorie. Merci d'avoir animé mes journées, merci pour votre soutien et nos échanges. Je remercie chaleureusement Mallorie Dépond, pour toute l'aide que tu as pu m'apporter aussi bien scientifiquement que personnellement. Merci pour tout ce que tu m'as appris, merci pour les moments partagés, pour toutes les discussions scientifiques, techniques et personnelles. Merci pour ta gentillesse et le temps précieux que tu m'as chaque jour accordé. Je ne te remercierais jamais assez pour ton soutien, tes encouragements, ta bienveillance et ton amitié. Sans toi, mes choix m'auraient conduit à une fin bien différente.

Je souhaite également remercier Sophie pour le soutien, l'écoute et les conseils. Merci pour toutes ces heures que tu as passé à me conseiller, à m'aiguiller tant sur le plan professionnel que personnel. Merci pour l'aide que tu m'as apporté dans les moments difficiles comme dans les meilleurs. Merci pour ta présence lors de la dernière ligne droite.

Ma thèse n'aurait pas été la même sans la présence des deux ingénieurs avec qui je l'ai réalisée. Merci à Mélanie Nehlich sans qui mes débuts auraient été bien plus compliqués. Un grand merci à Adeline Mayeux qui durant 2 ans m'a apporté du soutien, une présence au sein de l'équipe DBA et son amitié. Je te souhaite le meilleur pour ta vie future. Merci les filles.

Je remercie Martina pour son amitié, son aide et son écoute. Merci pour nos moments « sportifs » qui nous permettaient de se changer les idées. Merci pour nos discussions et nos échanges scientifiques entre deux centri du L2. Merci pour les moments partagés. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Je remercie également Suella, pour tous tes encouragements, tes paroles bienveillantes et chaleureuses qui m'ont aidées durant ces deux années ensemble au labo. Merci pour le temps passé à m'aider pour finaliser ma thèse.

Je souhaite remercier également toutes les personnes qui ont pris part d'une façon ou d'une autre à ma vie de doctorante : Emmanuelle, pour ta gentillesse et ton amitié, pour nos discussions et ton soutien. Sandrine pour nos échanges et ton aide dès que je le sollicitais. Michaël pour le temps que tu as accordé à m'aider sur un plan bien difficile de la vie professionnelle. Sans ton écoute, je n'aurais pu arriver là où j'en suis. Merci à Laurène et Païline pour vos conseils techniques. Je suis heureuse d'avoir pu nouer avec vous deux une amitié qui perdure malgré votre départ de l'unité. Merci à tous les autres doctorants (Ralf, Mahmoud, Sarah, Karim, Lucie, Sara, Maria, Alice, Benoit, Camille, et nouvellement Auria) d'avoir animé le labo durant ces trois années. Merci à Graziella, pour nos discussions et les échanges autour de notre amour pour l'Amérique Latine. Merci à tous les membres des équipes 1, 3 et 4. Vous avez apporté le soleil à mes jours pluvieux.

Un merci tout particulier à Julie, Jean-Philipe et Séb. Sans vous, la cytométrie en flux multiparamétriques serait toujours un très grand mystère pour moi. Merci Julie pour ton amitié. Puissions-nous nous retrouver à Montréal.

Je voudrais remercier Flavia et Hongxia, qui m'ont toutes deux initiées à la culture des cellules érythroïdes et m'ont permis de me perfectionner. Merci également à Yaël pour ton aide à l'avancement de mon projet. Merci de m'avoir permis de réaliser mes Western blot et ma production dans ton équipe.

Je remercie spécialement les patients atteints d'ABD qui ont eu la générosité de bien vouloir me donner un peu d'eux même afin de réaliser mes études. Merci également à toutes les mamans qui ont bien voulu faire don de leur sang de cordon. Merci à toutes les équipes des différents hôpitaux pour leur contribution et à l'équipe du Dr Jérome Larghero de m'avoir transmis les prélèvements de sang de cordon.

Je remercie tous mes amis pour les sorties et les bons moments que nous partageons. Je remercie particulièrement ma bande de loulous pour vos messages d'encouragement, votre amitié sans faille et les souvenirs qui vont avec. Je remercie Caro, ma roomie pour m'avoir fait découvrir ton beau pays, pour tous tes petits plats mexicains, pour ce magnifique voyage et toutes les notes musicales qui accompagnent ces bons moments. Merci à Alex d'avoir été là dans la période difficile. Sans nos soirées AHS, sushi et footballistiques je n'aurai pu remonter à la surface. Je remercie tous ceux qui par mégarde j'aurais oublié.

Parce que chaque étudiant le sait, le soutien de ses proches est primordial au cours de cette folle aventure. Le mot de la fin est dédié bien évidemment à ma famille. Un grand merci à mes parents qui ont toujours cru en moi. Je m'excuse pour tous les cheveux blancs que cette thèse vous aura apporté mais sans vous, sans votre amour, sans votre soutien et vos sacrifices, je n'aurais jamais pu atteindre la ligne d'arrivée. Vous êtes les piliers de ma vie. Merci également à ma sœur, pour nos moments, pour ses messages pleins d'amour, sa gentillesse et sa bonté. Merci à mes grands-parents, oncles et tantes, cousins et cousines pour leur soutien, leurs messages et leur aide. Enfin, le dernier mais pas des moindres, je souhaite remercier mon compagnon, Salem. Merci pour ton amour, pour ta confiance et ton soutien inconditionnel à chaque instant de ma thèse. Tel le soleil de ma vie, tu me guides et me donnes chaque jour la force d'avancer. Merci pour tout ce que tu fais pour faciliter mon quotidien.

RESUME

L'anémie de Blackfan-Diamond (ABD) est une érythroblastopénie congénitale rare secondaire à un blocage de la maturation des cellules érythroïdes entre les stades BFU-e (EPO indépendant) et CFU-e (EPO dépendant). La maladie se manifeste par une anémie arégénérative, le plus souvent macrocytaire. Dans 50% des cas, à l'anémie s'associe un syndrome malformatif affectant l'aire céphalique et les extrémités et incluant un retard de croissance. Bien que très hétérogène tant phénotypiquement que génotypiquement, l'ABD est due à des mutations toujours hétérozygotes dans des gènes de protéines ribosomiques (RP) pour 80% des cas. Le premier gène identifié comme impliqué dans l'ABD est le gène de la RPS19 (RPS19), faisant de l'ABD la première ribosomopathie décrite. A ce jour, 20 gènes de RP ont été identifiés. L'haplo-insuffisance en RP entraîne un défaut de maturation des ARN ribosomiques (ARNr) générant un stress nucléolaire, qui lui-même conduit à la stabilisation de la protéine p53. La p53 stabilisée induit l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire qui sont responsables en grande partie de l'érythroblastopénie. Plus rarement, l'ABD peut être la conséquence de mutations présentes sur le gène *GATA-1* (facteur de transcription majeur de l'érythropoïèse), le gène *TSR2* (interagissant avec la protéine RPS26 et intervenant dans la biogenèse des ribosomes) ou encore le gène *EPO* (cytokine clé de l'érythropoïèse). Cependant, 20% des patients atteints d'ABD ne sont toujours pas génotypiquement diagnostiqués : de nouveaux gènes candidats sont encore à découvrir chez ces patients. Dans cette perspective, l'objectif de ma thèse a donc été de caractériser le rôle fonctionnel de nouveaux gènes candidats afin de confirmer leur lien avec l'ABD. Nous avons procédé à un séquençage d'exomes chez 25 familles ce qui a permis d'identifier 8 gènes candidats. Nous présentons ici quatre de ces gènes dont deux gènes codant pour un chaperon ribosomique : *HSPA14* et *HEATR3*, un gène codant pour une RP : *RPL9* et un gène codant un facteur de croissance : *CECR1*.

Les protéines chaperons du ribosome représentent un nouveau groupe de gènes pouvant être associé à la maladie. Mes travaux de thèse ont permis d'étudier la prolifération, la division, l'amplification, la différenciation et la viabilité des cellules primaires érythroïdes issues des patients porteurs de variations alléliques dans ces gènes. Ces expériences ont permis de mettre en évidence un défaut de prolifération érythroïde chez l'ensemble des patients testés accompagné d'une diminution de l'amplification et de la division cellulaire ainsi qu'un retard de différenciation. Ces résultats sont objectivés par la persistance des marqueurs d'immaturité CD34 et IL-3R ainsi que d'un retard d'apparition des marqueurs terminaux tels que la BAND3 ou l'alpha4-intégrine. L'étude transcriptionnelle et protéique met en évidence une stabilisation

de p53, conduisant à une activation de ces cibles p21 et de bax. Le travail est finalisé pour HEATR3 (manuscrit en préparation) et en cours de finalisation pour HSPA14.

L'étude sur le gène *RPL9* grâce à un travail collaboratif a permis de mettre en évidence deux phénotypes différents en fonction du variant allélique identifié : un phénotype ABD pour un variant allélique de la 5'UTR ou un phénotype associé à un risque de cancer. L'étude de la différenciation érythroïde montre un impact sur la différenciation et la prolifération pour le variant lié à l'ABD uniquement. Parallèlement, une étude en collaboration sur le gène *RPL13*, a permis de confirmer le rôle spécifique de certaines protéines RP dans d'autres pathologies que l'ABD et d'ajouter une nouvelle maladie à la liste des ribosomopathies.

Le facteur de croissance CECR1, identifié comme muté chez plusieurs familles du consortium EURODBA, représente un nouveau groupe de gènes pouvant être associés à la maladie. Mes travaux de thèses, bien qu'ils soient à leurs prémices, ont permis d'étudier la différenciation érythroïde des cellules primaires issues de patients montrant un défaut de prolifération. Ces résultats sont objectivés par la persistance du marqueur d'immaturité IL-3R ainsi qu'un retard d'apparition du marqueur terminal GPA. Avec l'identification et la caractérisation de ce gène, de nouvelle implication peuvent être mises en évidence. En effet, bien qu'une érythroblastopénie congénitale soit caractérisée elle ne semble pas être responsable d'une ribosomopathie habituellement observée dans l'anémie de Blackfan-Diamond.

Au total, nous avons pu confirmer l'implication de 3 nouveaux gènes impliqués dans l'ABD ; les autres 5 autres gènes sont à l'étude. De façon intéressante, notre travail ouvre la voie à de nouvelles voies de signalisation qui seront autant de nouvelles pistes thérapeutiques pour les patients

Mots-clés : Anémie de Blackfan-Diamond ; érythroblastopénie ; ribosomopathie ; protéine chaperon ; HSP70 ; biogenèse des ribosomes, érythropoïèse

ABSTRACT:

Diamond-Blackfan anemia (DBA) is a congenital rare erythroblastopenia due to a blockage in the maturation of erythroid cells between the BFU-e and CFU-e stages. DBA is characterized by an aregenerative, usually macrocytic, anemia, associated with the total absence or less than 5% of erythroid precursors in the bone marrow. In 50% of DBA cases, anemia is associated with congenital malformations affecting the cephalic area and the extremities of the limbs and a growth delay. The DBA phenotype and genotype are heterogeneous, however a mutation in a ribosomal protein (RP) gene, always at heterozygous state, is found in 80% of cases. Up to date, 20 RP genes have been associated with DBA pathophysiology, establishing DBA as the first identified ribosomopathy. Mutations of these RP induce a defect in rRNA maturation. Therefore, for ribosome dysfunction, cell cycle arrest and p53-mediated apoptosis induction are responsible for erythroblastopenia in patients. More rarely, DBA may be the consequence of mutations present on a non-PR gene: the GATA-1 gene (major transcription factor of erythropoiesis), the TSR2 gene (interacting with the RPS26 protein and involved in ribosome biogenesis) or the EPO gene (erythropoiesis key cytokine) have been identified so far. However, 20% of the DBA patients are still not genotypically diagnosed, leaving room for the discovery of new candidate genes. In this perspective, the aim of my PhD was therefore to identify new candidate genes involved in DBA etiology and characterize their functional roles of in order to confirm their link with DBA. For this purpose, we sequenced exomes on 25 families and identified 8 candidate genes. In this manuscript, I will present my work as part of a bigger project to validate four new genes involved in BDA pathophysiology.

RPL9 is a RP of the large 60S ribosomal subunit. Mutations in this gene lead to two different phenotypes depending on the allelic variant: a DBA phenotype for an allelic variant of the 5' UTR or a phenotype associated with a cancer risk. As part of a collaborative work that compared the two RPL9 variants, I showed that the DBA variant only has an impact on erythroid differentiation Compared to a healthy individual, patients presenting the DBA variant exhibit a reduced proliferation rate and a delay in the acquisition of erythroid markers. P53-dependent activation of p21 in those cells is most likely responsible for the cell cycle arrest. Activation of caspases sign an induction of apoptosis and is consistent with the reduced viability of erythroid progenitors. A collaborative study on the RPL13 gene confirmed the specific role of certain RP proteins in non-DBA diseases and added a new disease to the list of ribosomopathies

Ribosome chaperone proteins represent a new group of genes that may be associated with DBA. I investigated the proliferation, division, amplification, differentiation and viability of primary erythroid cells from patients with allelic variations in one of these genes: HEATR3. These experiments revealed a lack of erythroid proliferation, with a defect in cell division. The mRNA and protein quantifications showed a stabilization of p53, leading to an activation of its targets: p21, controlling cell cycle, and Bax, involved in apoptosis induction. We also observed a delay in differentiation with the persistence of CD34 and IL-3R immaturity markers and a delay in the appearance of terminal markers such as BAND3 or alpha4-integrin. The role of HSP70 controlling GATA1 localization in early stages of the erythroid differentiation was recently elucidated. In this work, I identified as a new candidate gene for DBA, a HSP70 family member, HSPA14, and I characterized the defects in erythroid differentiation induced by this variant. Furthermore, I was able to identify an association of DBA with a variant in CECR1 gene encoding an adenosine deaminase in several families of the EURODBA consortium. Here I present the initial results to validate this new gene as a candidate for DBA. Interestingly, our work paves the way for identifying new signaling pathways that can be of use to develop new therapeutic strategies for patients.

Keywords: Diamond-Blackfan anemia; ribosomopathy; erythroblastopenia; ribosomal chaperone; HSP70; ribosome biogenesis; erythropoiesis

SOMMAIRE

Liste des illustrations XVII
Liste tableau XIX
ABREVIATION XX
Chapitre 1 : Erythropoïèse 4
I. L'hématopoïèse 4
A. Hiérarchie de l'hématopoïèse (modèle classique) 4
1. Les cellules souches hématopoïétiques 4
2. Les cellules souches hématopoïétiques multipotentes 6
3. Les progéniteurs 7
4. Les précurseurs 9
5. Les cellules matures 9
B. Holocracie de l'hématopoïèse (nouveau modèle) 10
C. Les différents organes hématopoïétiques au cours de l'ontogenèse 12
II. Différenciation érythroïde 15
A. Érythropoïèse précoce 16
1. Les BFU-e 16
2. Les CFU-e 16
3. Caractéristiques phénotypiques au cours de la différenciation précoce 18
B. Erythropoïèse tardive 19
1. Les précurseurs 19
2. Les cellules matures : réticulocytes et globules rouges 20
3. Caractéristiques phénotypiques au cours de la différenciation tardive 22
C. Les îlots érythroblastiques 22
III. Régulation de l'érythropoïèse 25
A. Régulation de l'érythropoïèse par les facteurs de croissance 26
1. Régulation de l'érythropoïèse par l'érythropoïétine 26
a. Synthèse de l'érythropoïétine 26
b. Fonction et régulation de l'érythropoïétine 27
c. Le récepteur à l'érythropoïétine 29
d. Les différentes voies de signalisation du récepteur EPOR (figure 12) 31
e. La régulation négative de la signalisation EPO/EPOR 37
2. Régulation de l'érythropoïèse par le Stem Cell Factor et son récepteur c-kit 40

a. Synthèse du Stem Cell Factor 40
b. Le récepteur du SCF : c-kit 40
c. Rôle de la signalisation SCF/c-kit dans l'érythropoïèse 41
d. EPOR/c-kit dans l'érythropoïèse 42
B. Régulation de l'érythropoïèse par les autres facteurs de croissance 43
1. Les hormones 43
a. L'insuline, l'IGF-1 et IGF-2, hormone de croissance et leur récepteur 43
b. Les hormones stéroïdiennes 44
2. Les cytokines 47
a. Les principales interleukines 47
a. Le TNF-α 49
b. Interféron -ϒ 49
c. TGF-β (Transforming growth factor β) 50
C. Régulation de l'érythropoïèse par les facteurs de transcription 50
1. Les facteurs trans-régulateurs de l'érythropoïèse 51
a. GATA-1 et GATA-2 51
b. Les autres facteurs trans-régulateurs de l'érythropoïèse 56
D. Régulation de l'érythropoïèse par les microARN 58
E. Régulation de l'érythropoïèse par l'apoptose 61
1. Les récepteurs de mort et leurs ligands 61
2. Rôles des caspases 63
Chapitre 2 : L'anémie de Blackfan-Diamond (ABD) : une érythroblastopénie congénitale ... 68
I. Historique de l'ABD 68
II. Caractéristique phénotypique de la maladie 69
A. Aspect épidémiologique et présentation clinique de l'anémie de Blackfan-Diamond 69
1. Aspect épidémiologique 69
2. Aspect clinique 70
B. Aspect biologique de l'ABD 72
1. Erythroblastopénie 72
a. NFS et réticulocytes 72
b. Le myélogramme 72
2. La conservation de caractéristiques fœtales de l'érythropoïèse 72
3. L'adénosine désaminase érythrocytaire (eADA) 73

C. Les traitements actuels et les traitements innovants en développement pour l'ABD 74
1. Les traitements actuels de l'anémie de Blackfan-Diamond 74
a. Les glucocorticoïdes 74
b. La transfusion sanguine 76
c. La greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques 76
2. Les traitements innovants en développement 77
a. Thérapie génique 77
b. Les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) 79
c. Petites molécules 79
D. L'évolution clinique de l'anémie de Blackfan-Diamond 80
III. Caractéristiques génétiques de la maladie 81
A. Le premier gène découvert : la protéine ribosomique RPS19 81
B. Les autres gènes de protéines ribosomiques 83
C. Le gène codant la protéine ribosomique RPL9 : un variant du gène potentiel non validé 85
D. De nouveaux gènes identifiés dans la maladie : des gènes qui ne sont pas des gènes de RP 88
1. Le gène GATA-1 88
2. Le gène *TSR2* 90
3. Le gène EPO 90
IV. Les mécanismes physiopathologiques de l'Anémie de Blackfan-Diamond 92
A. Modèles animaux dans l'étude de l'ABD 92
1. La drosophile 92
2. Le poisson zèbre (figure 23 a-b) 93
3. Le modèle murin (figure 23c) 93
B. L'anémie de Blackfan-Diamond, une maladie du ribosome 96
1. Biogenèse normale du ribosome 96
2. La synthèse des protéines 98
a. Les ARN ribosomiques 98
b. Les protéines ribosomiques 100
c. Les différentes étapes de la synthèse protéique (figure 29) 104
3. Défaut des protéines ribosomiques et de la maturation des ARNr, activation de la p53 et altération de la traduction eu cours de l'ABD 109
a. Atteinte des RP et de la maturation des ARNr au cours de l'ABD 109
b. Activation de la p53 au cours de l'ABD 112

c. Altération de la traduction au cours de l'ABD 115
C. Rôle de HSP70 et de GATA-1 et leur implication dans le défaut de l'érythropoïèse au cours de l'ABD 116
Chapitre 3 : Les protéines chaperons et les chaperons du ribosome 122
I. Les protéines de chocs thermiques 122
A. Classification des HSPs et leurs fonctions 123
1. Familles des HSP70 123
2. Une HSP70 : HSPA14 125
a. Structure et expression de HSPA14 125
b. Principales fonctions cellulaires 126
c. Régulations connues de la protéine HSPA14 127
II. Les protéines chaperons du ribosome et des protéines du ribosome 129
A. Généralités sur les chaperons des RP et ribosomes 129
B. Une protéine chaperon liée au transport et à l'assemblage de la protéine ribosomique : HEATR3 132
1. Structure et expression de HEATR3 132
2. Les principales fonctions connues de la protéines HEATR3 134
Chapitre 4 : De nouvelle implication : un érythroblastopénie congénitale mais non responsable d'une ribosomopathie 138
I. Généralité sur le gène CECR1 138
A. Structure et expression de la protéine 138
B. Les fonctions de ADA2 138
II. Déficit en ADA2 139
Chapitre 5 : Projet de recherche 144
Chapitre 6 : Matériels et méthodes 148
I. Cultures cellulaires 148
A. Les cellules primaires CD34+ 148
B. Lignées lymphoblastoïdes EBV issues de patients ou de témoins sains 149
II. Cytométrie de flux 149
A. Etude de la différenciation érythroïde 149
B. Etude de l'apoptose et de la viabilité cellulaire 150
C. Etude du cycle cellulaire 150
III. Western blot 151
IV. La transcription inverse et PCR quantitative 153
V. Test statistiques 154

Chapitre 7 : Résultats 158
I. Identification de nouvelles protéines ribosomiques impliquées dans l'ABD et dans diverses ribosomopathies 160
A. Variations alléliques du gène RPL9 160
1. Contexte scientifique 160
2. Résultats 161
3. Conclusion 162
B. Variations alléliques du gène RPL13 196
1. Contexte scientifique 196
2. Résultats 196
3. Conclusion 197
II. Identification de gènes candidats via des analyses de l'exome chez des familles atteintes d'ABD (Hôpital R. Debré, Paris) 218
A. Une protéine chaperon appartenant à la famille des HSP70 : HSPA14 220
1. Phénotype et génotype d'un cas d'ABD particulier 220
2. Etude de l'érythropoïèse dans les cellules primaires *ex vivo* du patient ABD porteur de la variation allélique du gène *HSPA14* 220
a. Nombre de cellules $CD34^+$ 220
b. Etude de la prolifération des cellules $CD34^+$ *ex vivo* mises en culture 222
c. Etude des marqueurs de surface au cours de la différenciation érythroïde *ex vivo* 225
d. Etude du cycle cellulaire : une distribution différente des cellules 229
3. Etude de la biogenèse du ribosome chez le patient atteint d'ABD porteur de variations alléliques du gène HSPA14. 232
B. Une protéine chaperon de RP : HEATR3 235
1. Phénotype et génotype d'un cas particulier d'ABD 235
2. Etude de l'érythropoïèse dans les cellules primaires *ex vivo* de la famille du patients ABD porteurs de variations alléliques du gène *HEATR3* 236
a. Nombre de cellules CD34+ 236
b. Etude de la prolifération des cellules $CD34^+$ mises en culture 237
c. Etude des marqueurs de surface au cours de la différenciation érythroïde *ex vivo* 240
3. Etude de l'expression des protéines chez le patient porteur de mutation sur un gène codant pour un chaperon de ribosome, HEATR3 242
4. Etude de l'expression des gènes chez le patient porteur de mutation sur un gène codant pour un chaperon de ribosome, *HEATR3* 245

a. Dans les lignées lymphoblastoïdes infectées par EBV obtenues à partir de cellules lymphocytaires de la famille 245

b. Dans les cellules érythroïdes issues de $CD34^+$ obtenues à partir d'échantillon de sang périphérique de la famille d'un témoin sain 246

5. Etude de la biogenèse du ribosome chez le patient atteint d'ABD porteur de variations alléliques du gène *HEATR3* 248

III. Un nouveau gène identifié chez des patients diagnostiqués ABD ayant une érythroblastopénie mais non responsable d'une ribosomopathie 250

A. Identification d'un nouveau gene sans lien avec la biogenèse du ribosome ou l'érythropoïèse 250

1. Phénotype et génotype des patients 250

2. Etude de l'érythropoïèse dans les cellules primaires ex vivo du patient français ABD porteurs de variations alléliques du gènes *CECR1* 250

a. Nombre de cellules $CD34^+$ 251

b. Etude de la prolifération des cellules $CD34^+$ mises en culture 251

a. Etude des marqueurs de surface au cours de la différenciation érythroïde 253

Chapitre 8 : Discussion 258

Bibliographie 272

Annexes

Liste des illustrations

Figure 1: Division asymétrique des CSH. 5
Figure 2: Modèle classique de l'hématopoïèse. 8
Figure 3 : Représentation des deux concepts de l'hématopoïèse**.** 10
Figure 4 : Schématisation de l'hématopoïèse : les différentes modifications épigénétiques permettent l'hétérogénéité des CSHs. 11
Figure 5 : Niche hématopoïétique : un environnement riche et complexe. 13
Figure 6 : Les différents organes hématopoïétiques chez l'Homme en fonction de l'âge 14
Figure 7 : Aspect morphologique des cellules en différenciation érythroïde 17
Figure 8 : Marqueurs de surface caractérisés à chaque stade de la différenciation érythroïde. 18
Figure 9 : Schématisation d'un îlot érythroblastique constitué d'érythroblastes à différents stades de maturation autour d'un macrophage médullaire. 23
Figure 10 : Représentation des îlots érythroblastiques. Ils sont composés d'un macrophage central et de cellules érythroïdes et sont la première niche hématopoïétique découverte 25
Figure 11 : Régulation de l'érythropoïèse par l'hypoxie et l'EPO. 28
Figure 12 : Illustration des voies de signalisation de l'érythropoïétine**.** 31
Figure 13 : Modèle de synergie entre PPAR- α et les GR.. 46
Figure 14 : Représentation du profil d'expression des facteurs de transcriptions GATA-1 et GATA-2 au cours de la différenciation érythroïde . 52
Figure 15 : Schématisation du complexe Transcriptionnel activateur de GATA-1**.** 55
Figure 16 : Schématisation de la biogenèse des miRNA. 59
Figure 17 : Représentation des différents facteurs dont les miRNA ayant un rôle dans l'hématopoïèse 61
Figure 18 : Régulation de l'apoptose au cours de l'érythropoïèse. 63
Figure 19 : Schématisation de la régulation positive et négative de l'érythropoïèse par les facteurs de croissance et les récepteurs de mort. 66
Figure 20 : Schéma de la protéine RPS19. 82
Figure 21 : Schéma descriptif du rôle des mutations RP et GATA-1 au cours de l'érythropoïèse dans l'ABD**.** 89
Figure 22 : Structure et rôle de la protéine TSR2. 91
Figure 23: Illustrations de modèles animaux dans l'anémie de Blackfan-Diamond. 95
Figure 24 : Synthèse et turnover des ribosomes au sein de la cellule. 97
Figure 25 : Conformation du complexe UtpB (Hunziker et al., 2019). 99
Figure 26 : Modèle du processus de formation de la petite sous-unité du ribosome (SSU). 100
Figure 27 : Schéma du transport nucléocytoplasmique dépendant de Ran. 102
Figure 28 : Modèle d'activité de la protéine ribosomique dans la biogenèse du ribosome... 103
Figure 29 : Schéma représentatif des 3 principales étapes de la synthèse protéique 106
Figure 30 : Schématisation de la voie d'initiation de la traduction des eucaryotes. 107
Figure 31 : Phase d'élongation de la synthèse protéique chez les eucaryotes 108
Figure 32: Anomalie de la maturation des ARNr en fonction des gènes mutés au cours de l'ABD. 111
Figure 33: Modulation de la stabilisation de la protéine p53 via les protéines ribosomiques RPL5 et RPL11. 113

Figure 34: Activation de la voie p53 au cours de l'anémie de Blackfan-Diamond. 114
Figure 35: Les différents phénotypes de l'Anémie de Blackfan-Diamond modulés par la protéine HSP70. 119
Figure 36: Schématisation de la boucle rétrocontrôle entre GATA-1 et l'hème au cours de la différenciation des globules rouges (Doty et al., 2019). 121
Figure 37: Schéma mécanistique de la protéine HSPA14 intracellulaire inhibant la maturation des cellules dendritiques dérivés des monocytes (MoDC) (Yi et al., 2019). 128
Figure 38 : Schématisation des différents rôles fonctionnels des chaperons dédiés aux RP 131
Figure 39 : Structure de Syo1 (HEATR3 chez l'humain) et du complexe Syo1-RPL5-RPL11.. 134
Figure 40 : Schématisation de l'import du complexe Syo1-RPL5-RPL11 au sein du noyau via Kap104 et se lie à l'ARNr 5S. 135
Figure 41: Modélisation du rôle de Syo1 dans l'assemblage de la RNP 5S (d'après Calvino et al., 2015). 136
Figure 42: Protocole de culture cellulaire selon Hu et al., 2013. 149
Figure 43: Schématisation de l'apparition des différents marqueurs cellulaires au cours de la différenciation érythroïde. 150
Figure 44: Nombre de cellules $CD34^+$ extraites après isolement de PBMCs à partir de sang total de patient ABD (UPN#961) ou de témoins (CTL). 221
Figure 45: Défaut de prolifération cellulaire des cellules érythroïdes issues des CD34+ issues du sang périphérique du patients ABD (UPN#961) portant une variation allélique du gène HSPA14 et d'un témoin (CTL). 223
Figure 46 : Défaut d'amplification et de division cellulaire des cellules CD34+ issues de sang périphérique du patients ABD (UPN#961) et de témoins (CTL) en cours de différenciation érythroïde. 224
Figure 47: Persistance des marqueurs d'immaturité à la surface des cellules érythroïdes issues des $CD34^+$ au cours de la différenciation érythroïde. 226
Figure 48 : Retard des marqueurs de différenciation à la surface des cellules érythroïdes issues des $CD34^+$ au cours de la différenciation érythroïde chez le patient ABD porteur du variant HSPA14 et un contrôle. 229
Figure 49: Cycle cellulaire chez le patient porteur du variant HSPA14.. 231
Figure 50: Le variant HSPA14 induit différents profils des polysomes. 233
Figure 51: Le variant HSPA14 présente des défauts dans le processus de biogenèse du ribosome. 234
Figure 52: Nombre de cellules CD34+ extraites après isolement de PBMCs à partir de sang total de patient ABD (UPN#603) ou de témoins (CTL, UPN#700, UPN#697). 237
Figure 53 : Défaut de prolifération cellulaires des cellules érythroïdes issues de $CD34^+$ issues de sang périphérique de patient ABD (UPN#603) portant deux variations hétérozygotes composites du gène HEATR3 et de témoins. 238
Figure 54: Défaut d'amplification et de division cellulaire des cellules CD34+ issues de sang périphérique du patient UPN#603 et de témoins (CTL) en cours de différenciation érythroïde. 239
Figure 55: Persistance des marqueurs d'immaturité à la surface des cellules érythroïdes issues des CD34+ au cours de la différenciation érythroïde chez le patient ABD porteur des variations alléliques de HEATR3. 241

Figure 56: Etude de l'expression des protéines dans la lignée lymphoblastoïdes issues des cellules du patient UPN#603 et d'un contrôle. 244
Figure 57 : Expression transcriptionnelle des différents gènes dans les cellules lymphoblastoïdes issues du patient ABD UPN#603 et du témoin UPN#700. 246
Figure 58: Expression transcriptionnelle des différents gènes dans les cellules $CD34^+$ mises en cultures et issues du patient ABD UPN#603 porteur du variant HEATR3, de ses apparentés (UPN#700 et UPN697) et d'un témoin sain. 247
Figure 59: Le variant HEATR3 induit différents profils des polysomes. 248
Figure 60: Les variants HEATR3 présentent des défauts dans le processus de biogenèse du ribosome.. 249
Figure 61: Diminution du nombre de cellules $CD34^+$ extraites à partir de sang total du patient ABD (UPN#975) et d'un témoin sain (CTL). 251
Figure 62 : Léger défaut de prolifération des cellules érythroïdes du patient porteur de variants CECR1 et d'un témoin sain. 252
Figure 63: Défaut d'amplification et de division cellulaire des cellules CD34+issues de sang périphérique du patient porteur de variants CECR1 et d'un témoin sain. 253
Figure 64: Persistance du marqueur d'immaturité IL-3R et retard d'apparition du marqueur de différenciation CD36 à la surface des cellules érythroïdes issues des $CD34^+$ au cours de la différenciation érythroïde chez le patient ABD porteur de variants CECR1 254

Liste tableau

Tableau 1: Les diverses malformations les plus caractéristiques observées dans l'Anémie de Blackfan-Diamond (d'après Clinton & Gazda., 2019)..... 71
Tableau 2 : Critères de diagnostiques de l'ABD adapté selon Vlachos et al., 2008 73
Tableau 3 : Les différents gènes mutés dans l'ABD. 86
Tableau 4 : récapitulatif des différentes ribosomopathies..... 87
Tableau 5: Présentation de quelques membres de la famille HSP70 125
Tableau 6 : Caractérisation de quelques chaperons dédiés aux RP..... 132
Tableau 7: Références des anticorps primaires et secondaires utilisés pour les Western Blot. 152
Tableau 8: Séquences des amorces de RT-qPCR quantitative (Taqman)..... 153

ABREVIATION

A.

ABD : Anémie de Blackfan-Diamond

Ace : érythroblaste acidophile

ADN : acide désoxyribonucléique

AGM : aorte-gonade-mésonephros

Akt : protéine kinase

AMP : adénosine monophosphate

AMPK : AMP- activated protein kinase

AP-1 : activator protein 1

Ask-1 : apoptosis signal-regulated kinase 1

APAF1 : Apoptosis protease activating factor-1

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messager

ARNnc : ARN non codant

ARNr : acide ribonucléique ribosomal

ARNt : acide ribonucléique de transfert

ATF-2 : activating transcription factor 2

ATP : adénosine triphosphate

ARF : alternate reading frame

B.

BAG1 : Bcl-2- associated athanogene-1

Bad : Bcl-2-associated death promoter protein

Bcl-xL : B-cell lymphoma-extra large

BFU : burst forming unit

BFU-e : burst forming unit-erythroid

BFU-MK : burst forming unit-megacaryocytaire

bHLH : basic helix-loops-helix

Bim : Bcl-2-like protein 11

BTG1 : B cell translocation gene 1

Btk : bruton’s tyrosine kinase

B - Trcp : Beta Transducing repeat-containing protein

C.

CBP : creb binding protein

Vbl : casitas B-lineage lymphoma

CFU : colony forming unit

CFU-baso : colony forming unit-basophile

CFU-e : colony forming unit-erythroid

CFU-Eo : colony forming unit-eosinophile

CFU-G : colony forming unit-granulocyte

CFU-GEMM : colony forming unit - granulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte

CFU-GM : colony forming unit-granulo-macrophagique

CFU-L : colony forming unit-lymphoid

CFU-M : colony forming unit-macrophage

CFU-MK : colony forming unit-megakaryocyte

CFU-S : colony forming unit-spleen

CFU-B : colony forming unit-B (lignées lymphocytaires B)

CFU-T : colony forming unit-T (lignées lymphocytaires T)

CIS : cytokine-induced STAT inhibitor

c-Kit : récepteur du stem cell factor

CLP : progéniteur lymphoïde commun

CMP : progéniteur myéloïde commun

c-Myb : myeloblastocis viral oncogene homolog

CREB : c-amp response element-binding protein

CRIK : citron rho-interacting kinase

CSH : cellule souche hématopoïétique

CXCR4 : C-X-C Motif Chemokine Receptor 4

CXCL12 : C-X-C Motif Chemokine Ligand 12

Cys : cystéine

D.

Daxx: death domain-associated protein

DBA : Diamond-Blackfan anemia

DBD : DNA binding domain

DISC : Death-indicing signaling complex

DKC : dyskératose congénitale

DNA : deoxyribonucleic acid

Dsk : dark skin

E.

E2F2 : E2F transcription factor 2

EA : érythroblastes acidophiles

eADA : adénosine désaminase érythrocytaire

EB : érythroblastes basophiles

EIF2 : eukaryotic translation initiation factor 2

EKLF : erythroid kruppel-like factor

Emp : erythroblast macrophage protein

EP : érythroblastes polychromatophiles

EPO : érythropoïétine

EPO-R : récepteur à l'érythropoïétine

ERK 1 et 2 : extracellular regulated kinase 1 et 2

ETS : external transcribed spacer

EVS : Exome Variant Server

F.

FADD : Das-associated protein with death domain

Fas-L : fas ligand

FIH-1 : factor inhibiting HIF-1

FOG-1 : friend of GATA-1

FOXO3 : forkhead box O3

FRO : formes réactives de l'oxygène

G.

GAB1 et 2 : GRB2 associated binding protein 1-2

GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GAS : Interferon-gamma activated sequence

GATA-1 : GATA binding protein 1

GATA-2 : GATA binding protein 2

GDP : guanosine diphosphate

GC : glucocorticoïdes

Gfi-1b : growth factor independent 1b transcription repressor

GFP : green fluorescent protein

GH : growth hormon

GMP : progéniteur granulo-macrophagique

GPA : glycophorine A

GR : récepteur des glucocorticoïdes

Grb2 : growth factor receptor-bound protein 2

GRE : glucocorticoid regulatory element

GSK3 : glycogen synthetase kinase 3

GTP : guanosine triphosphate

H.

Hb : hémoglobine

HDAC : Histone désacétylases

HDM2 : human double minute 2

HEATR3 : HEAT repeat containing 3

HIF : hypoxia inductible factor

HIP : HSC70 Interacting protein

HLA-DR : human leukocyte antigen du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

HOP : HSP70-HSP90 Organizing protein

HRE : heme responsive elements

HRI : heme regulated kinase

HSE : Heat shock element

HIS : Heat shovk factor-1

HSP : Heat shock protein

HSP70 : heat shock protein 70

HSP27 : heat shock protein 27

HSP90 : heat shock protein 90

HSPA14 : heat shock protein Family A (HSP70) member 14

I.

ICAD : protéine inhibitrice de la protéase CAD

ICAM : intercellular adhesion molecule

Id2 : inhibitor od DNA binding 2

IFNa : interferon-α

IFNγ : interferon-γ

IGF-1 : insulin-like growth factor 1

IGF-2 : insulin-like growth factor 1

Ig-like : Immunoglobuline-like

IL-1 : interleukine-1

IL-1β : interleukine-1 beta

IL-2 : interleukine-2

IL3 : interleukine-3

IL6 : interleukine-6

IL-10 : interleukine -10

IL-12 : interleukine-12

IL-15 : interleukine-15

IL-18 : interleukine-18

IL-3R : interleukine-3 récepteur

INF-γ : interféron γ

iNOS : inducible nitric oxide synthase

IP3 : inositol 1,4,5-trisphosphate

iPSC : induced pluripotent stem cell

IR : récepteur à l'insuline

IRS-2 : insulin receptor substrate 2

ITS : internal transcribed spacer

J.

JAK2 : Janus kinase 2

JH : JAK homology

JNK : jun kinase

K.

KLF1 : Kruppel like factor 1

KIT-LG : KIT ligand

L.

Ldb1: LIM domain binding protein 1

LCL : Lymphoblastoid Cell Line

LMO2 : LIM domain only 2

LT-HSC : long-term repopulating hematopoietic stem cells

Lyn : Lck/yes-related novel tyrosine kinase

M.

MAPK : mitogen activated protein kinase

MBD2 : methyl-CpG binding domaine protein 2

MDM2 : mouse double minute 2

MEC : matrice extra-cellulaire

MEP : progéniteur érythro-mégacaryocytaire

Met : méthionine

MGG : may-grünwald giemsa

MGF : Mast-cell Growth Factor

MFI : médiane d'intensité de fluorescence

miARN : micro ARN

MoDC : cellules dendritiques dérivées des monocytes

MPF : maturation-promoting factor

MPP : multipotent progenitor

mSCF : stem cell factor membranaire

mTORC1 : mammalian target of rapamycin C1 complex

N.

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate H^+

NEF: Nucleotide Exchange Factors

NES : nuclear exportation signal

NF-E2 : nuclear factor erythroid-2

NF-KB : nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells

NK : natural killer

NLS : signal de localisation nucléaire

Nrf : NF-E2 related factor

NuMa : nuclear-mitotic apparatus protein

Nup : nucleoporin

O.

O_2 : dioxygène

P.

PARP1 : poly(ADP-ribose) polymérase I

PBK : protein kinase B

PE : proérythroblastes

PHD2 : prolyl hydroxylase domain protein 2

PKC : protéine kinase C

PI3K : phosphatidyl-inositol 3 kinase

PIAS : protein inhibitor of activated STATs

PIP_2 : Phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphate

PIP_3 : Phosphatidyl-inositol-4,5-triphosphate

PLC : progéniteur lymphoïdes communs

PLC : phospholipase C

PMC : progéniteur myéloïde commun

PME : progéniteurs mégacaryocytaire / érythrocyte

PR : protéines ribosomiques

Pré-B : pré-lymphocyte B

Pré-NK : pré-Natural Killer

Pré-T : pré-lymphocyte T

Pro-B : pro-lymphocyte B

Pro-E : pro-érythroblaste

Pr-NK : pro – Natural Killer

Pro-T : pro-lymphocyte T

pRb : protéine du rétinoblastome

pVHL : protéine von Hippel Lindau

R.

Rb : rétinoblastoma tumor suppressor

RISC : RNA-induced silencing complex

RMRP : RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease

ROS : reactive oxygen species

RPL : ribosomal protein large subunit

RPS : ribosomal protein small subunit

RTK III : récepteurs à activité tyrosine kinase de classe III

RT-qPCR : reverse transcription quantitative polymerase chain reaction

S.

SAPK : stress-activated protein kinase

SCF : Stem cell factor

sSCF : stem cell factor soluble

SCID : severe combined immunodeficiency

SDF-1 : stromal derived factor-1

Ser : sérine

SMD : syndromes myélodysplasiques

SH2 : Src homology 2

SHP-1 : Src Homology-2 containing Phosphatase-1

ShARN : short hairpin ribonucleic acid

SHIP1 et 2 : SH-2 containing inositol 5’ polyphosphatase 1 et 2

SiARN : smal interfering ribonucleic acid

SnARN : small nucleolar ARN

SnoRNP : small nucleolar ribonucleic acid

SNP : single nucleotide polymorphism

SnRNPS : small nuclear ribonucleoProtein

SOCS : suppressor of cytokine signaling

SOS : son of sevenless

SP-1 : specificity protein – 1

STAB1 : special AT-rich binding protein 1

STAT : signal de transduction activateur de transcription

ST-HSC : short-term repopulating hematopoïetic stem cells

T.

TGF-β1 : transforming growth factor β1

TIBC : capacité totale de liaison du fer

TNF-α : tumor necrosis factor α

TRBP : TAR RNA binding Protein

TRPC2 : transient receptor potential cation channel 2

U.

Ub : ubiquitinylé

UTR : untranslated región

ULK-1 : Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1

V

VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule 1 p

Vegfb : vascular endothelial growth factor B

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Erythropoïèse

I. L'hématopoïèse

L'hématopoïèse est le processus biologique complexe concourant à la production et au remplacement continu et régulé des cellules sanguines qui sont les érythrocytes, également appelés hématies ou globules rouges, les plaquettes et les leucocytes, comprenant les lymphocytes B et T, les monocytes et les granulocytes.

L'hématopoïèse est un processus pyramidal initié à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui s'engageront dans une des lignées hématopoïétiques conduisant à des progéniteurs possédant des capacités prolifératives importantes. Ces progéniteurs deviennent, à la suite de leur maturation et leur différenciation, des précurseurs hématopoïétiques puis des cellules sanguines matures. Ainsi, l'érythropoïèse est la partie de l'hématopoïèse qui faisant suite à plusieurs étapes de prolifération, de maturation et de différenciation aboutit aux progéniteurs multipotents (MPP), bipotents (MEP) et monopotents (BFU-e, CFU-e) devenant par la suite des précurseurs érythroblastiques qui matureront en érythrocytes. Chez une personne adulte, ce sont environ 200 milliards d'érythrocytes qui sont produits par jour avec une durée de vie de 120 jours. Par ailleurs, 125 milliards de plaquettes et 50 milliards de leucocytes sont générées par jour afin de maintenir l'homéostasie au sein de l'organisme (Dombret 1996).

A. Hiérarchie de l'hématopoïèse (modèle classique)

1. Les cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) possèdent deux propriétés primordiales. Elles ont d'une part, une capacité à s'auto-renouveler – c'est-à-dire que les CSHs ont la faculté de se diviser en une cellule fille identique à la cellule mère – et d'autre part, une capacité de multipotence – c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier en n'importe quelle cellule hématopoïétique (Becker, Mcculloch, & Till, 1963). Cependant, les CSHs de la moelle osseuse, représentant seulement 0.01 à 0.1% des cellules médullaires totales, sont indifférenciées et quiescentes en phase G_0 du cycle cellulaire. Les CSHs ont une division asymétrique. Ainsi, la cellule souche hématopoïétique quiescente, qui entre en cycle, se divise que très rarement

(Rumman, Dhawan, & Kassem, 2015). Les CSHs quiescentes présentent un métabolisme ralenti et une capacité de reconstitution à long terme supérieure aux CSHs en cycle (Passegué et al., 2005). En effet, une diminution de la transcription des ARN et un métabolisme diminué des CSHs quiescentes ont été démontrés à la suite d'analyses génétiques réalisées à partir de CSHs quiescentes et en cycle (Venezia et al., 2004). De récents travaux portant sur la quiescence de cellules souches décrivent cet état comme semblable à celle de la diapause embryonnaire (Scognamiglio et al., 2016). Il s'agit d'un arrêt spontané et succinct du développement embryonnaire des parasites, des insectes et de certains mammifères (souris, marsupiaux) se réalisant indépendamment des facteurs extérieurs (Méd. Biol. T.1 1970). Puis, l'embryon sort de cet état et poursuit son développement. Cependant, la CSH quiescente peut entrer en cycle en réponse à divers stimuli (comme le stress, les hormones ou les facteurs de croissance). Afin d'assurer une hématopoïèse physiologique, il est donc primordial d'avoir un parfait équilibre entre la quiescence, l'entrée en cycle des CSHs et leur différenciation (figure 1).

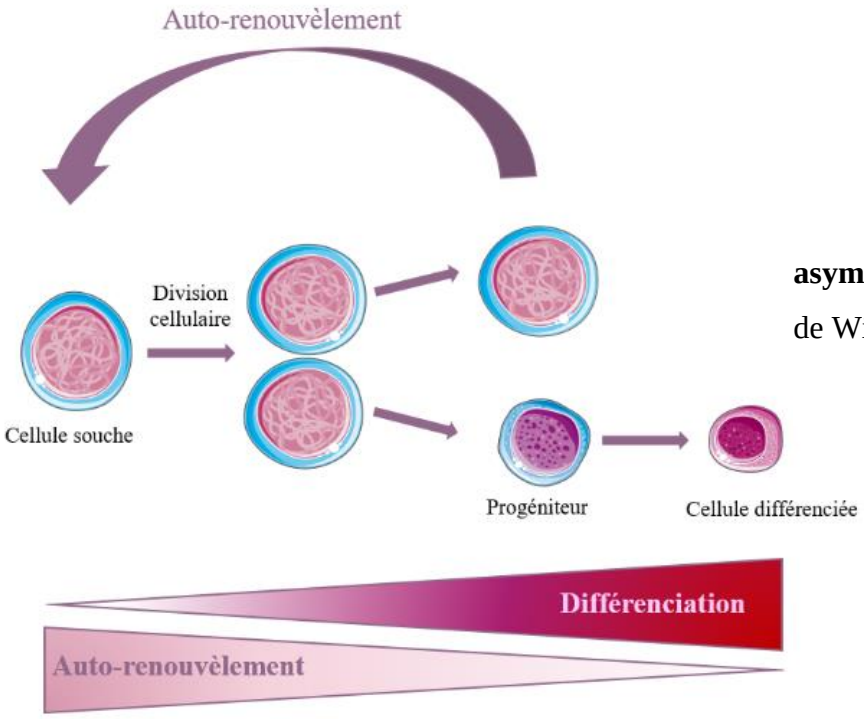


Figure 1: Division asymétrique des CSH. (Adaptée de Wilson & Trumpp, 2006)

A ce jour, deux modèles s'opposent sur l'organisation et la hiérarchisation de l'hématopoïèse. D'une part le modèle stochastique (Till, McCulloch, & Siminovitch, 1964)

dans lequel la finalité de la CSH est un phénomène aléatoire indépendant de l'environnement cellulaire. Ce modèle se base sur l'hypothèse que les cellules progénitrices exprimeraient différents récepteurs de cytokines en fonction de leur environnement. D'autre part, le modèle déterministe (J. P. Novak & Stewart, 1991) dont l'hypothèse posée est que chaque cellule possède un caractère propre lui permettant de devenir uniquement ce pour quoi elle est destinée. Ainsi, la cellule progénitrice engagée dans une voie de différenciation serait régulée par les cytokines, les facteurs de croissances et les diverses interactions cellulaires.

Il est possible de classifier les cellules hématopoïétiques en quatre groupes fonction de leur capacité de renouvellement, de prolifération et de différenciation.

2. Les cellules souches hématopoïétiques multipotentes

C'est en 1961, par l'expérience de Till et McCulloch (TILL & McCULLOCH, 1961) que l'existence de la multipotence des CSHs a été mise en évidence pour la première fois. Pour cela, des cellules médullaires de souris furent greffées chez des souris syngéniques dont la moelle fut préalablement irradiée détruisant de cette façon toutes les cellules souches hématopoïétiques. Ces expériences ont mis en évidence l'existence de clones au niveau de la rate appelés colony forming unit-spleen (CFU-S) contenant des progéniteurs multipotents capables de générer des colonies érythroïdes, granulocytaires et mégacaryocytaires. Ce fut la preuve que dans les cellules injectées lors de la greffe syngénique, il y avait des cellules capables de reconstituer l'ensemble du tissu hématopoïétique. Ainsi, les cellules de la greffe contenaient des CSHs qui ont induit une hématopoïèse normale avec une différenciation en toutes les cellules.

Les CSHs sont classées en deux catégories selon leurs marqueurs membranaires et leur capacité d'auto-renouvellement (Ema, Morita, & Suda, 2014). D'une part, les plus primitives appelées CSHs de longue durée – ou LT-HSC pour « Long-Term repopulating Hematopoetic Stem cells », dont le phénotype est $CD34^{+}$ $CD38^{-}$ $CD133^{-}$. Ces cellules possèdent une capacité de reconstitution de tous les lignages du système hématopoïétique et une capacité importante d'auto-renouvèlement. D'autre part, les CSHs de courte durée, ou ST-HSCs pour « Short-Term repopulating Hematopoietic Stem cells », provenant de LT-HSCs différenciées dont le phénotype est $CD34^{+}CD38^{low}$ (Majeti, Park, & Weissman, 2007). Les ST-HSC ont toujours la

capacité de donner toutes les cellules hématopoïétiques, mais ont une capacité d'auto-renouvèlement moindre. Chez des animaux irradiés, les ST-HCS assurent une production transitoire de moins de trois mois des cellules lymphoïdes et myéloïdes.

Dans des conditions physiologiques, alors que 90% du pool de CSHs restent dans la moelle à l'état de quiescence et permet ainsi d'avoir une réserve en cas de besoin, 10% se divisent et se différencient. Les ST-HSCs passent ainsi au stade de progéniteurs multipotents (MPP).

3. Les progéniteurs

Les progéniteurs hématopoïétiques représentent 1% des cellules médullaires. Bien qu'ils gardent une grande capacité de prolifération, les MPP perdent la capacité d'auto-renouvellement. Ils donnent naissance à des progéniteurs engagés dans la différenciation, identifiables par des marqueurs de surface spécifiques de la lignée (Civin et al., 1996 ; J. Li et al., 2014). Les progéniteurs sont mis en évidence par leur capacité à donner *in vitro* des colonies morphologiquement identifiables lors des tests clonogéniques de culture cellulaire à court ou à long terme.

Initialement, deux types de progéniteurs hématopoïétiques se distinguent : i) pour la lignée lymphoïde, le CFU-L – ou CLP pour « Progéniteur Lymphoïde commun » - donnant les progéniteurs CFU-T et CFU-B des lignées lymphocytaires T et B et ii) un progéniteur commun à toutes les lignées myéloïdes, CFU-GEMM – ou CMP pour « Progéniteur Myéloïde Commun ». Ce dernier peut devenir un progéniteur GMP (pour « Progéniteur Granulo-Monocytaire ») également appelé CFU-GM (pour « Colony Forming Unit-Granulo-Monocytaire »). Le CFU-GM est à l'origine du CFU-M (pour « CFU-Monocyte ») et CFU-G (pour « CFU-Granulocyte »). Le CMP est à l'origine des CFU-Eo (pour « CFU-Eosinophile ») et du CFU-Baso (pour « CFU-Basophile ») conduisant respectivement aux précurseurs des polynucléaires éosinophiles et des polynucléaires basophiles. Le CFU-GEMM peut également donner un progéniteur bipotent MEP (pour « Progéniteur Erythro-Mégacaryocytaire »). Par la suite, le MEP se différencie soit en progéniteurs monopotents érythroïdes BFU-e (pour « Burst Forming Unit-Erythroid ») puis en CFU-e (pour « Colony Forming Unit-Erythroid ») soit en progéniteurs monopotents mégacaryocytaires BFU-MK (pour « Burt Forming Unit–Mégacaryocytaire ») puis en CFU-MK (pour « Colony Forming Unit – Mégacaryocytaire »).

Une fois le progéniteur engagé, il se divise, mature et se différencie pour donner naissance aux précurseurs (figure 2).

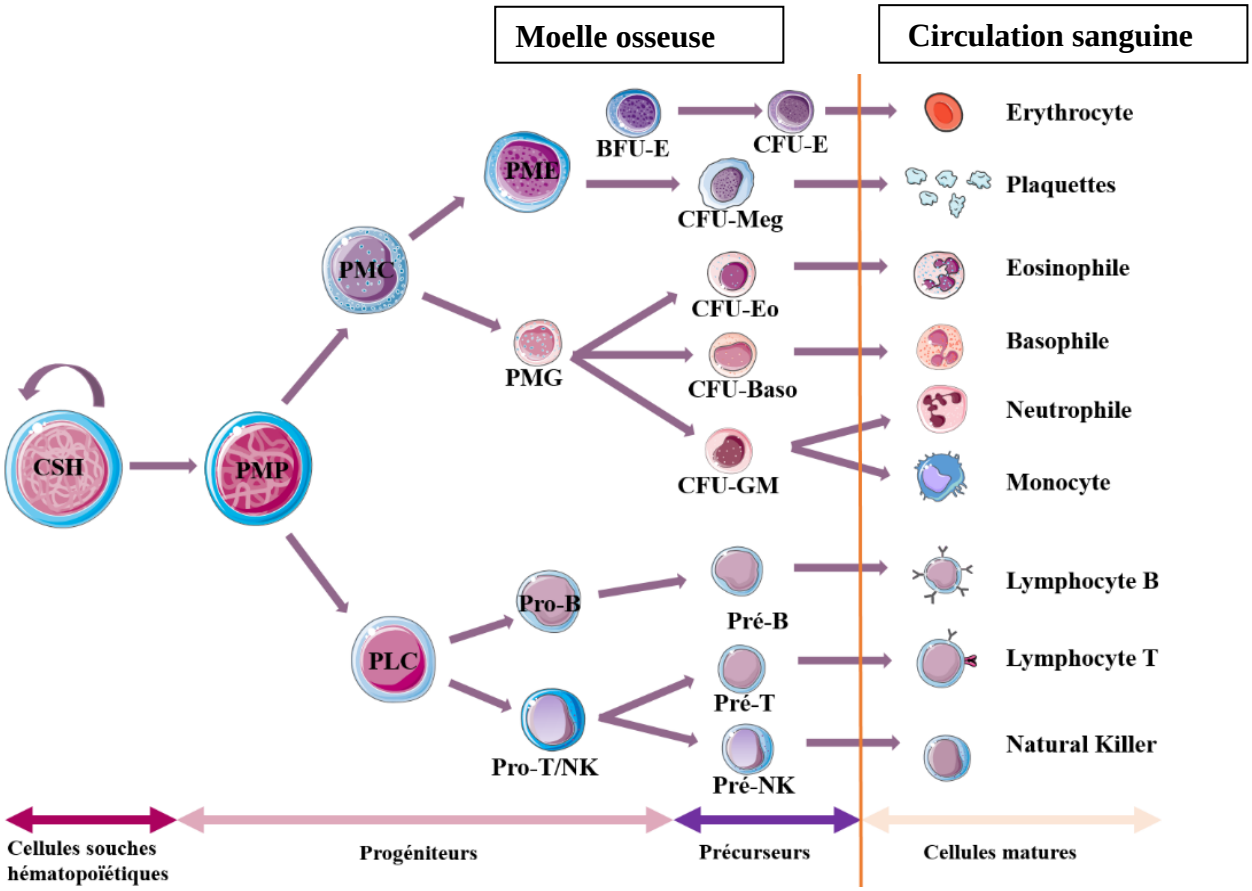


Figure 2: Modèle classique de l'hématopoïèse. Les cellules souches hématopoïétiques peuvent soit s'auto-renouveler soit générer des progéniteurs multipotents (PMP) s'engageant dans la voie lymphoïde ou myéloïde pour donner respectivement les progéniteurs lympoïdes communs (PLC) et les progéniteurs myéloïdes communs (PMC). Ces deux lignées sont à l'origine de toutes les cellules du sang de l'organisme (d'après Dzierzak et Philipsen).

PME : Progéniteur mégacaryocyte/érythrocyte : PGM : Progéniteur granulocyte/monocyte ; CFU- : Colony forming units ; BFU- : Burst forming units ; E : érythroïde ; Meg : Mégacaryocyte ; GM : Granulomonocyte ; Baso : Basophile ; Eo : Eosinophile ; Pro-T/NK et Pro-B : Pro-lymphocyte T ou B et Pro-Natural Killer ; Pré-T et Pré-B : Pré-lymphocyte T ou B ; Pré-NK : Pré-Natural Killer

4. Les précurseurs

Les précurseurs sont localisés dans la moelle osseuse et tout comme les progéniteurs (hormis les MPP qui restent multipotents), ils ont perdu la capacité d'auto-renouvellement et la propriété de multipotence. Cependant, les précurseurs ont des capacités de prolifération diminuées et des capacités de maturation et de différenciation plus importantes que celles des progéniteurs. Pour les lignées érythrocytaire et leucocytaires, chaque stade de maturation correspond à une division cellulaire : suite à la mitose, une ou deux cellules filles sont différentes de la cellule mère. Les précurseurs de chaque lignée sont les premières cellules morphologiquement identifiables au microscope en fonction de leur taille, de la structure chromatinienne, du rapport nucléo-cytoplasmique et l'aspect du cytoplasme. L'observation et le compte des cellules se fait au microscope sur frottis médullaire après coloration May-Grünwald Giemsa (MGG). De plus, les cellules commencent à exprimer des marqueurs phénotypiques spécifiques à leur lignée. Par exemple, l'antigène glycophorine A (GPA également appelée CD235a) et les antigènes du système ABO et rhésus sont spécifiques à la lignée érythroïde, l'antigène CD15 à la lignée granulo-monocytaire, le CD14 à la lignée monocytaire et le complexe antigénique plaquettaire GpIIb/IIIa (CD41), le CD42, FVIII à la lignée mégacaryocytaire.

5. Les cellules matures

La plupart des cellules matures obtenues (érythrocytes, plaquettes, polynucléaires, neutrophiles, éosinophiles, basophiles, lymphocytes, et monocytes) au cours de l'hématopoïèse vont quitter la moelle osseuse et passer dans le sang où elles termineront leur maturation (ex : maturation des réticulocytes en globules rouges matures). Pour les leucocytes, le sang est uniquement un passage vers un autre tissu dans lequel elles assureront leur fonction.

B. Holocracie de l'hématopoïèse (nouveau modèle)

Depuis quelques années, un nouveau concept de l'hématopoïèse émerge dans lequel la capacité de différenciation des CSHs n'est pas fixée dans une hiérarchisation traditionnelle mais flexible (Notta et al., 2016) (figure 3). La population des CSHs est hétérogène, composée de différents types de cellules dont le potentiel de renouvellement et de différenciation diffère considérablement (Dykstra et al., 2007 ; Benz et al., 2012; Ema et al., 2014; Morita & Lindsay, 2007; Yamamoto et al., 2013).

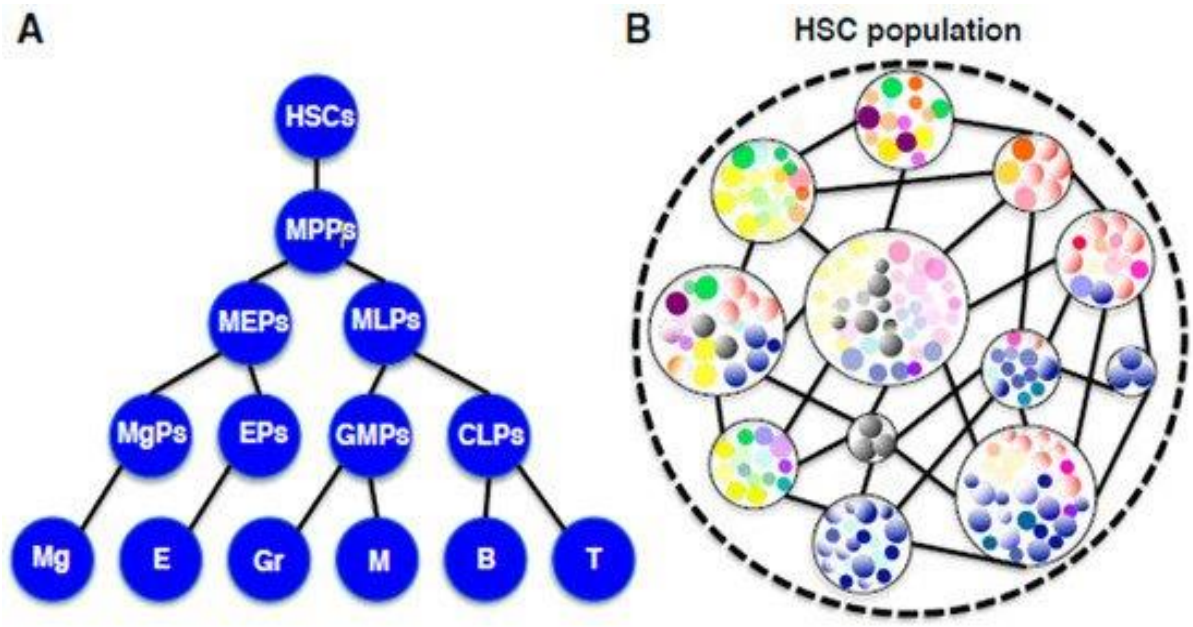


Figure 3 : **Représentation des deux concepts de l'hématopoïèse.** (A) Le diagramme hiérarchique traditionnel de l'hématopoïèse où les CSHs possèdent des capacités d'auto-renouvellement et de différenciation et génèrent des progéniteurs restreints à leur lignée. (B) Un nouveau diagramme basé sur les récentes études clonales réalisées présentant une mise en réseau des CSHs (J. Sun et al., 2014). Dans ce nouveau modèle, la population des CSHs contient des unités de CSHs individuelles dans lesquelles un clone de CSH et ses progéniteurs représentent un spectre. Chaque unité de CSH existe dans le réseau qui est constitué de cellules hématopoïétiques, de cellules environnementales et d'interactions entre elles (de Kruijf, Fibbe, & van Pel, 2019).

De récentes études d'analyse clonale montrent que chaque clone de CSH se comporte de manière autonome dans sa propre trajectoire qui est déterminée par la configuration épigénétique et par la régulation transcriptionnelle (figure 4) (Doi et al., 2018; V. W. C. Yu et al., 2016). Une grande partie de la population de CSHs est constituée de progéniteurs engagés dans une lignée et possédant une activité d'auto-renouvellement remettant ainsi en cause le concept d'un système hiérarchique de l'hématopoïèse (Busch et al., 2015; J. Sun et al., 2014). De plus, certains des progéniteurs engagés dans une lignée dérivent directement des CSHs multipotentes insinuant que les CSHs produisent les cellules sanguines de manière flexible et dynamique (Velten et al., 2017; Yamamoto et al., 2013). Une de ces études a démontré l'importance de la protéine SATB1 (Special AT-rich binding protein 1) dans ce nouveau concept de l'hématopoïèse. L'étude suggère que l'expression de SATB1 est importante pour le maintien de l'auto-renouvellement et la multipotence. De plus, le niveau d'expression de la protéine SATB1 fluctue au cours de l'hématopoïèse dans les CSHs adultes. Ainsi, la protéine serait impliquée dans les mécanismes régulant le statut épigénétique des CSHs (Doi et al., 2018).

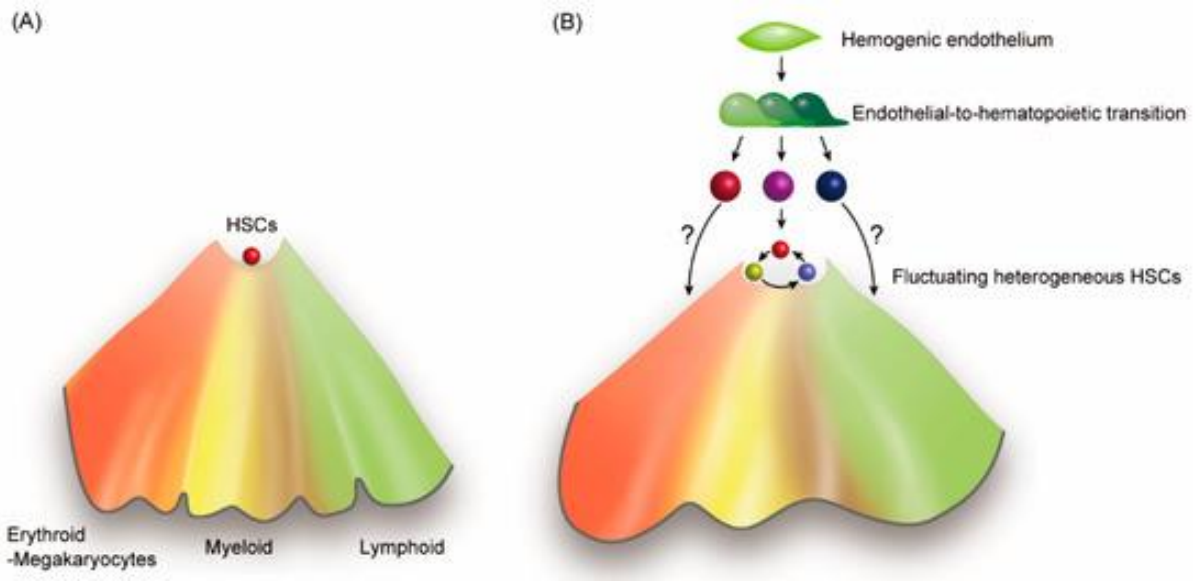


Figure 4 *:* **Schématisation de l'hématopoïèse : les différentes modifications épigénétiques permettent l'hétérogénéité des CSHs.** (A) Le modèle traditionnel de Waddington montre une décision du destin des CSHs en amont de l'hématopoïèse. (B) Les nouvelles données semblent indiquées une hétérogénéité des CSHs dont les tendances de lignage sont biaisées par l'épigénétique. Une étude récente montre que les précurseurs immédiats des CSHs ont déjà acquis leurs restrictions de lignées hématopoïétiques (Guibentif et al., 2017) (Illustration de Yokota, 2019).

C. Les différents organes hématopoïétiques au cours de l'ontogenèse

En 1978, Schofield définit la niche hématopoïétique comme un endroit spécifique permettant le maintien de la cellule souche hématopoïétique pour réguler, maintenir, protéger et soutenir l'hématopoïèse. Ce concept présente la niche comme un microenvironnement cellulaire et moléculaire où se localisent les CSHs et leurs progéniteurs (figure 5). Ce microenvironnement médullaire où se déroule l'hématopoïèse se localise dans la moelle osseuse des os plats chez l'Homme, au sein des cavités médullaires situées au centre des cylindres osseux diaphysaires. Plusieurs types cellulaires non hématopoïétiques ont été identifiés dans cet environnement : ostéoblastes, fibroblastes, adipocytes, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, filets nerveux, ainsi qu'une matrice extracellulaire constituée de glycoprotéines telles que le collagène de type I, II, III, IV et V, fibronectine, vibronectine, thrombospondine, laminine et protéoglycanes (Boulais & Frenette, 2015; van Pel, Fibbe, & Schepers, 2016). Les monocytes/macrophages, les lymphocytes, avec l'ensemble des cellules non hématopoïétiques constituent les cellules stromales. La niche participe à la régulation de l'hématopoïèse en synthétisant les divers facteurs de croissance contrôlant positivement ou négativement le processus. Les cellules du stroma médullaire produisent les chimiokines ou cytokines qui sont des facteurs d'adhésion, de survie, de prolifération et de différenciation. L'ensemble des travaux indique l'existence de plusieurs niches agissant à différents niveaux de la hiérarchie hématopoïétique. L'importance de ces différentes niches dépend de l'état de quiescence ou d'activation des CSHs (Mendelson & Frenette, 2014). Deux niches furent décrites dans la moelle osseuse, lieu de l'hématopoïèse. D'une part, une niche ostéoblastique située au niveau du tissu osseux entourant la cavité médullaire. Cette niche est composée d'une matrice extra-cellulaire et de trois types cellulaires : les préostéoblastes, les ostéoblastes et les ostéoclastes. Les ostéoblastes représentent l'élément clé de cette niche via leur implication dans la régulation de la quiescence, de la prolifération et du maintien à l'état indifférencié des CSHs (Taichman, 2005). Une augmentation de la population ostéoblastique induit une augmentation de la population des CSHs. Inversement, une diminution de cette population entraîne une diminution du nombre de CSHs. D'autre part, la moelle osseuse est parcourue par une niche vasculaire constituée par les vaisseaux sinusoïdes vasculaires. Cette niche contient essentiellement des cellules endothéliales qui sécrètent la chimiokine CXCL12 (également appelé SDF-1 pour « Stromal Derived Factor-1 »). L'interaction entre CXCL12 et son récepteur CXCR4 – acteur majeur du contrôle des interactions des CSHs avec leur niche -

est essentielle au maintien des CSHs dans la moelle osseuse adulte. De plus, il a été démontré que l'axe CXCR4/CXCL12 s'oppose à l'épuisement des cellules souches hématopoïétiques par une protection sélective du stress oxydatif en limitant la génération de ROS ainsi que le stress génotoxique (Yanyan Zhang et al., 2016). Contrairement à la niche ostéoblastique, lieu de la quiescence au stade G_0 du cycle cellulaire des CSHs, la niche vasculaire constituerait un micro-environnement favorable à la prolifération et à la différenciation des progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes. Cela est dû à une richesse en nutriments et en oxygène (Kopp, Avecilla, Hooper, & Rafii, 2005). Les mécanismes régulant les interactions des CSHs avec leur niche commencent à être mieux compris.

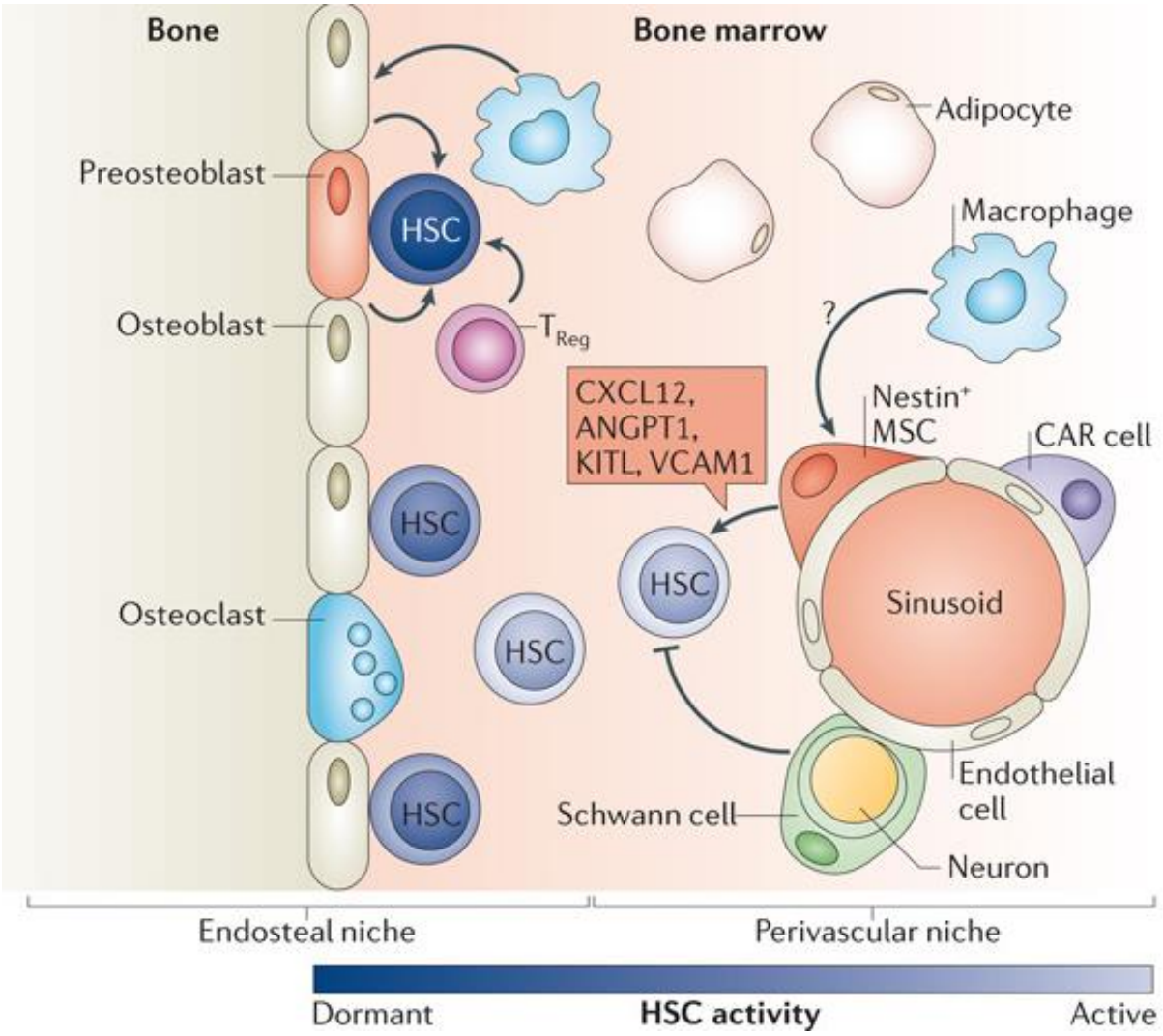


Figure 5 : Niche hématopoïétique : un environnement riche et complexe. La plupart des CSHs résident dans la moelle osseuse pouvant être subdivisée en niches endostéales et périvasculaires (Illustration de Ya-Chieh Hsu, 2013).

Les sites anatomiques où a lieu l'hématopoïèse changent en fonction de l'âge (figure 6). Différentes études chez la souris ont mis en évidence qu'au stade embryonnaire les CSHs proviennent de la région aorte-gonade-mésonephros (AGM) d'origine mésodermique (Gekas et al., 2005; A. M. Müller et al., 1994). Au cours de la vie intra-utérine, l'hématopoïèse humaine se passe au niveau de deux sites extra-embryonnaires : le sac vitellin (J0 à J8) et le placenta. L'hématopoïèse primitive a lieu dans le sac vitellin alors que l'hématopoïèse définitive a lieu dans l'AGM. Du deuxième au septième mois de développement fœtal, elle se déroule dans le foie et la rate. L'hématopoïèse commence dans la moelle osseuse vers le 4ème mois de la vie fœtale. A partir du 7ème mois de la vie intra-utérine et après la naissance, l'hématopoïèse se déroule à l'état physiologique uniquement dans la moelle osseuse (Godin & Cumano, 2007; Gurevitch, Slavin, & Feldman, 2007). Certains os du squelette produisent plus de CSHs que d'autres (sternum, base du crâne, os iliaque, vertèbres, maxillaires et épiphyses des os longs). De plus, la cellularité des os varie en fonction de l'âge. D'une façon générale, elle est maximale à la naissance et diminue au cours de la vie et selon une cinétique dépendant du territoire médullaire (Fernández & de Alarcón, 2013) (figure 6).

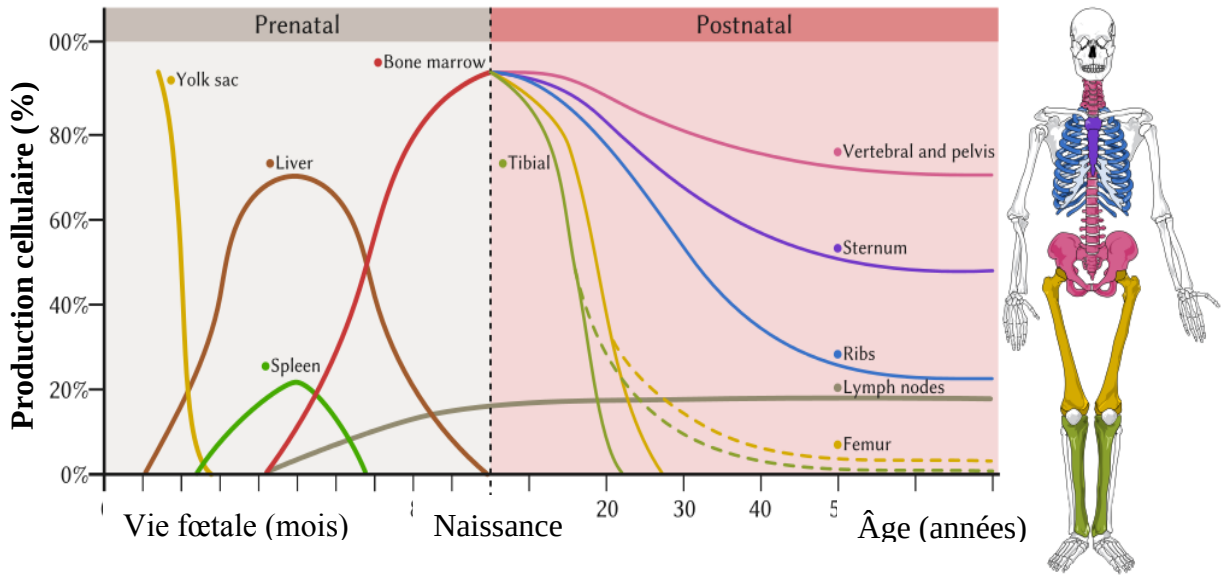


Figure 6 : Les différents organes hématopoïétiques chez l'Homme en fonction de l'âge (d'après Michal Komorniczak, 2011).

II. Différenciation érythroïde

L'érythropoïèse est le processus qui permet la production constante et régulée, au cours de l'hématopoïèse, de cellules matures érythrocytaires. Il s'agit donc du processus biologique permettant la production quotidienne de 200 milliards de globules rouges matures, également appelés hématies ou érythrocytes (Palis, 2014). Le niveau de production des globules rouges est maintenu à l'état d'équilibre par la production et la libération par diapédèse et en continue de cellules matures dans le sang afin d'équilibrer la perte quotidienne des cellules sénescentes (1/120). Après les 120 jours de la durée de la vie normale des globules rouges, les cellules sénescentes sont phagocytées par les macrophages de la moelle osseuse en situation physiologique et au niveau de la rate en condition pathologique (Bennett & Kay, 1981). Ces cellules matures ont pour principale fonction de maintenir à l'état fonctionnel l'hémoglobine (Hb) dont le rôle est le transport de l'oxygène depuis les poumons jusqu'aux divers organes. L'Hb est la protéine principale du globule rouge, elle représente un tiers du poids de la cellule. L'Hb est une molécule tétramérique formée de 4 chaînes de globine, α et β identiques 2 à 2, et dans chaque globine, d'un noyau central d'hème fixant le fer et l'oxygène.

Le processus de différenciation des cellules souches en réticulocytes et globules rouges est un processus finement régulé. Les cellules vont s'engager vers l'érythropoïèse, un processus comprenant plusieurs stades distincts phénotypiquement identifiables. Après s'être différenciés en progéniteurs bipotents érythroïdes/mégacaryocytaires, la cellule s'engagera définitivement vers la lignée érythroïde en se différenciant en progéniteurs érythroïdes monopotents (BFU-e et CFU-e) puis en précurseurs érythroblastiques pour finalement former des érythrocytes après énucléation des érythroblastes acidophiles et maturation des réticulocytes. Au fur et à mesure de ce processus de différenciation, les cellules voient diminuer leur taille générale ainsi que celle de leur noyau. Ce dernier finit par être expulsé de la cellule au stade d'érythroblaste acidophile.

L'érythropoïèse peut être divisée en deux grandes étapes : une phase d'érythropoïèse précoce (de la CSH au stade CFU-e) et une phase tardive (du stade proérythroblaste au stade érythrocyte). Alors que l'érythropoïèse précoce permet l'obtention des progéniteurs érythroïdes à partir de CSHs dont la multipotence se restreint, la phase tardive permet la production des globules rouges à partir des précurseurs identifiables au microscope.

A. Érythropoïèse précoce

L'érythropoïèse précoce correspond à la phase pendant laquelle la CSH s'engage définitivement vers la voie de différenciation érythroïde. Bien que les progéniteurs érythroïdes ne soient pas reconnaissables morphologiquement par coloration MGG, les différents progéniteurs et leur classement hiérarchique ont été établis en culture semi-solide de méthylcellulose, *in vitro* à partir de $CD34^+$ chez l'Homme (Bessis, 1958 ; J. Gregory & Eaves, 1978). Ainsi à partir d'une CSH qui se différencie en CMP, nous obtenons successivement les MEP, puis BFU-e et CFU-e (figure 7). Les BFU-e et CFU-e possèdent une grande capacité d'expansion cellulaire.

1. Les BFU-e

Les BFU-e ont la capacité de former des colonies à partir de CSHs mises en culture en méthylcellulose. Les BFU-e immatures représentent une population de 0,03% parmi les cellules hématopoïétiques médullaires. Seulement 40% des BFU-e entrent en cycle et prolifèrent (Iscove, Sieber, & Winterhalter, 1974). Chez l'Homme, les BFU-e immatures se différencient en 16 à 18 jours formant de grosses colonies (agrégats cellulaires avec une colonie correspondant à plus de 8 clusters) pouvant contenir plus de deux cents érythroblastes. A l'inverse, la BFU-e mature forment des colonies compactes en 10 à 12 jours de culture (une BFU-e est composée de 1 à 8 clusters) de plusieurs centaines de cellules. De plus, les BFU-e immatures sont les premiers progéniteurs à s'engager définitivement dans la voie érythroïde. La prolifération et la différenciation des cellules BFU-e nécessitent des cytokines de prolifération et de différenciation, le Stem Cell Factor (SCF), l'interleukine 3 (IL3) et l'érythropoïétine (EPO) (Vemuri et al., 2007).

2. Les CFU-e

Les CFU-e donnent des petites colonies de moins d'une centaine de cellules contenant uniquement un seul cluster avec une hémoglobinisation après 7 jours de culture en milieu semi-solide (Vemuri et al., 2007). Les CFU-e représentent 0,3% des cellules hématopoïétiques

médullaires et sont pour la plupart en cycle (Iscove, 1977). De plus, ces cellules perdent l'expression des marqueurs CD34 (une phosphoglycoprotéine transmembranaire, marqueur non spécifique de cellule souche) et HLA-DR (human leukocyte antigen appartenant au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II) mais expriment à leur surface le récepteur à l'EPO (EPOR), le récepteur à la thrombospondine (CD36) et le récepteur à la transferrine 1 (CD71 ou Tfr1). Elles peuvent également capter le fer transporté via la transferrine grâce au récepteur CD71.

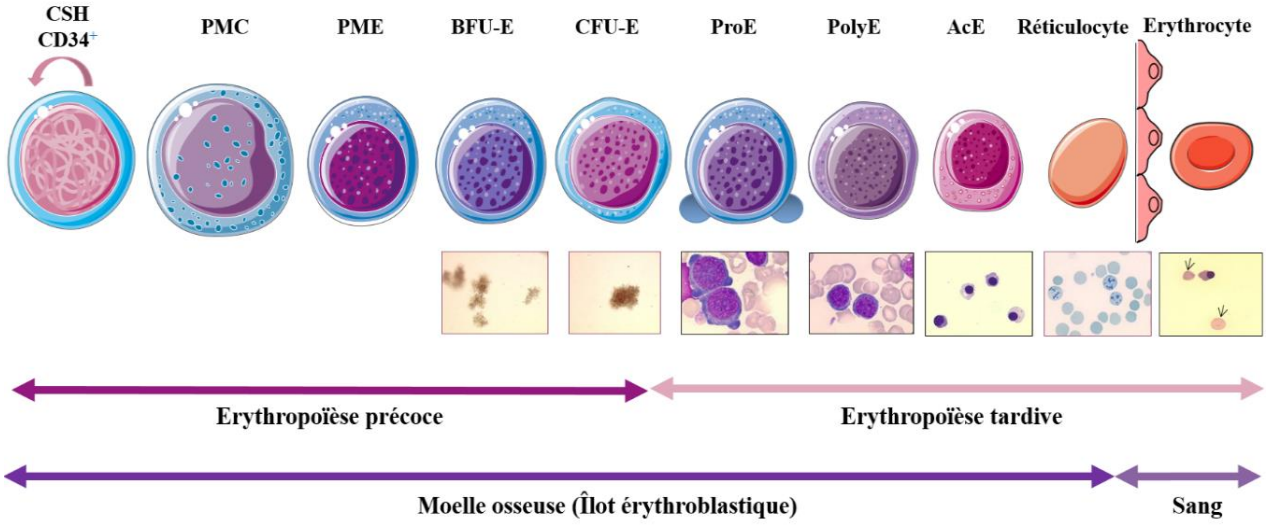


Figure 7 : Aspect morphologique des cellules en différenciation érythroïde (d'après l'université de Tours).

Les cellules étant très sensibles à l'EPO à ce stade sont dépendantes de ce facteur de croissance pour proliférer. On parle alors de stade EPO-dépendant. Les souris invalidées pour l'EPO et son récepteur meurent au stade embryonnaire, autour du treizième jour, non seulement à cause de l'anémie sévère, mais également à cause de malformations cardiaques et d'anomalies du développement cérébral (H. Wu, Liu, Jaenisch, & Lodish, 1995; X. Yu et al., 2002).

3. Caractéristiques phénotypiques au cours de la différenciation précoce

Les BFU-e immatures et matures expriment des marqueurs de différenciation à leur surface. Tandis que les premières expriment les marqueurs protéiques CD34, CD45, CD33, HLA-DR et CD117 (ou c-kit, le récepteur au SCF) mais pas celui du récepteur à l'EPO, les secondes expriment faiblement les marqueurs protéiques CD36 et EPOR (Broudy, Lin, Brice, Nakamoto, & Papayannopoulou, 1991; Iguchi et al., 1999). De plus, une faible expression du récepteur à l'IL3 est observée au début de l'érythropoïèse (S. Huang et al., 1999 ; Kohn et al., 2012; Manz et al., 2002). En 2014, des études portant sur l'isolement des BFU-e et CFU-e humaines ont permis de mieux caractériser les marqueurs de surface de ces cellules. Ces marqueurs peuvent être utilisés pour une meilleure discrimination des cellules progénitrices (J. Li et al., 2014). Ainsi les BFU-e sont $CD45^{+}$, $CD34^{+}$, $HLA\text{-}DR^{+}$, $CD117^{+}$, $IL3\text{-}R^{low}$, $CD36^{-}$, $CD33^{+}$, $CD71^{low}$, GPA^{-} et les CFU-e sont $CD45^{+}$, $CD34^{-}$, $CD117^{+}$, $IL3R^{-}$, $CD36^{+}$, $CD33^{+}$, $CD71^{high}$, GPA^{-} (figure 8).

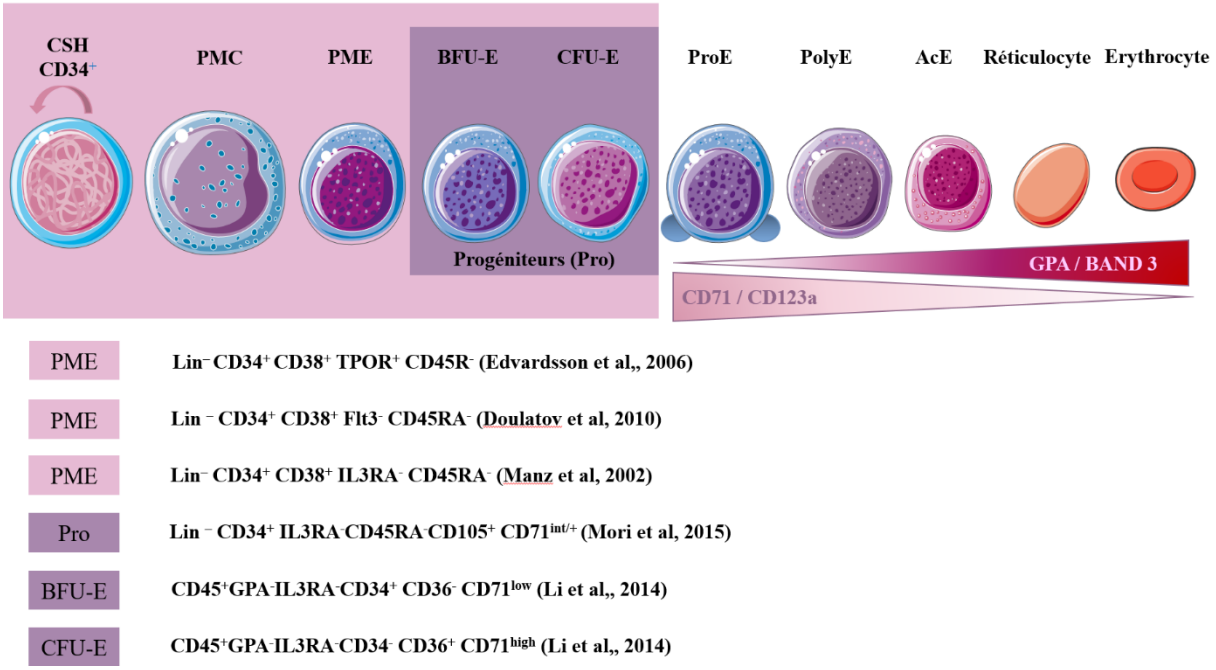


Figure 8 : Marqueurs de surface caractérisés à chaque stade de la différenciation érythroïde. *(D'après Nandakumar et al., 2016)*

B. Erythropoïèse tardive

La phase tardive de l'érythropoïèse correspond à l'étape au cours de laquelle un seul proérythroblaste donnera en 7 à 8 jours seize globules rouges suite à quatre divisions cellulaires. Les cellules CFU-e prolifèrent et se différencient en diverses précurseurs érythroïdes du stade proérythroblaste au stade érythroblaste acidophile (figures 7, 8).

1. Les précurseurs

Les érythroblastes sont les précurseurs érythroïdes de la moelle osseuse dont le proérythroblaste est le premier morphologiquement reconnaissable (Koury & Haase, 2015). Après une coloration par MGG et une observation au microscope optique, les érythroblastes sont identifiés et classés selon leur taille cellulaire, leur structure chromatinienne, leur rapport nucléo-cytoplasmique et la basophilie du cytoplasme. Au sein de l'îlot érythroblastique, le proérythroblaste va donner naissance à des érythroblastes basophiles de type I puis de type II. Ces derniers vont se différencier en érythroblastes polychromatophiles puis en érythroblastes acidophiles (également appelés orthochromatiques par les anglo-saxons). Au fur et à mesure du processus de différenciation, on observe une diminution de la taille cellulaire et une condensation de la chromatine. Le noyau devient pycnotique et le rapport nucléo-cytoplasmique diminue. Ces évènements sont essentiels à l'énucléation (Ji, et al., 2010 ; Popova et al., 2009) et sont accompagnés d'une hémoglobinisation progressive des cellules. Initialement très basophile, le cytoplasme des cellules devient progressivement acidophile du fait de la synthèse d'hémoglobine dans le cytoplasme et à la réduction progressive de la quantité des acides ribonucléiques. La diminution de la taille du noyau implique une réorganisation architecturale de l'enveloppe nucléaire. Alors que les protéines de structures constituant les pores nucléaires (Nup153, Nup62, Nup358, Tpr) sont redistribuées, les principales protéines de la matrice nucléaire et les facteurs d'épissage (NuMa pour « Nuclear-Mitotic Apparatus protein », snRNPS pour « Small nuclear Ribonucleoprotein ») persistent dans le noyau (S. T. Koury, Koury, & Bondurant, 1989). Ce remaniement permet le maintien transcriptionnel de certains gènes comme ceux codant les globines α et non- α ainsi que la protéine anti-apoptique Bcl-xL (B-cell-lymphoma-extra-Large). Tous ces phénomènes garantissent la poursuite du processus de différenciation érythroïde.

2. Les cellules matures : réticulocytes et globules rouges

L'ultime étape de la maturation est caractérisée par l'expulsion de toutes les organelles et du noyau de l'érythroblaste acidophile. La cellule finalisera sa maturation par l'énucléation donnant naissance au réticulocyte qui maturera lui-même dans la moelle ou qui migrera dans la circulation sanguine pour donner en 24h à 48h un globule rouge mature.

Chez les mammifères, l'énucléation est une étape indispensable de la maturation. Cette étape implique une migration du noyau vers une extrémité de la cellule suivie de son expulsion par bourgeonnement. Au cours de cette étape, la membrane plasmique entoure le noyau de cytoplasme intact et va former des extensions. Le noyau également appelé pyrénocyte reste lié au réticulocyte jusqu'à la scission de l'extension membranaire. Cette dernière exprime des phosphatidylsérines qui donnent le signal au macrophage de l'îlot érythroblastique pour débuter la phagocytose (Yoshida et al., 2005). D'autres études ont montré le rôle du facteur de transcription KFL1 au cours de l'énucléation (Parkins, Sharpe, & Orkin, 1995 ; Magor et al., 2015) en régulant notamment l'expression des protéines de la membrane nucléaire et du cycle cellulaire (Gnanapragasam & Bieker, 2017; Gnanapragasam et al., 2016). De récentes études chez la souris ont démontré que le facteur de transcription E2F-2 induit par les cyclines, qui est une cible directe de KLF1, semble jouer un rôle dans l'énucléation en induisant l'expression de la kinase CRIK (Citron Rho-interacting kinase). Cette dernière participe à la condensation nucléaire (Swartz et al., 2017). De plus, l'énucléation est un processus contrôlé par les GTPases, RAC consistant en la polarisation des cellules via une réorganisation des filaments d'actine (Konstantinidis et al., 2012). Au cours de l'énucléation, les gènes codant les protéines Rac 1 et Rac 2 participent à la formation des anneaux contractiles d'actine via leur interaction avec leur effecteur mDia2. L'altération de ces gènes inhibe la formation des anneaux contractiles d'actine et donc le processus d'énucléation (Ji, Jayapal, & Lodish, 2008).

À la suite de l'énucléation, le réticulocyte va poursuivre sa maturation dans le compartiment médullaire. Il y perdra 20 à 30% de sa surface cellulaire (Waugh et al., 1997 ; Lydie Da Costa et al., 2001) et éliminera toutes ses organelles par autophagie (Blanc et al., 2005) dont ses mitochondries et ses ribosomes. L'expression de la protéine NIX (protéine appartenant à la famille des protéines Bcl-2) est augmentée dans les érythroblastes en phase tardive de la différenciation. Des expériences chez la souris déficiente pour le gène codant la protéine NIX ont mis en évidence une réticulocytose due à un défaut de maturation des réticulocytes (Diwan et al., 2007). Alors que dans des conditions physiologiques normales, les

réticulocytes éliminent les mitochondries par autophagie et exocytose, en condition pathologique, lorsque NIX n'est plus exprimée, les autophagosomes ne peuvent finaliser leur maturation. Ainsi les mitochondries persistent et ne peuvent pas être éliminées par ces autophagosomes non fonctionnels (Schweers et al., 2007). Cette protéine NIX semble être la principale protéine mitochondriale impliquée lors de la différenciation érythroïde terminale (Sandoval et al., 2008). En plus d'être coexprimée avec la protéine anti-apoptotique Bcl-xL durant la phase terminale de la différenciation érythroïde, NIX est régulée positivement et induit une dépolarisation de la membrane mitochondriale (Aerbajinai et al., 2003; Novak et al., 2010). D'autres études ont mis en avant un second gène responsable de l'élimination des mitochondries et des ribosomes du réticulocyte. En effet, les souris déficientes pour le gène *ULK-1* (*ATG1*) codant pour la sérine/thréonine kinase Ulk-1 présentent une réticulocytose ainsi que 35% de globules rouges conservant leurs mitochondries et leurs ribosomes (Kundu et al., 2008). Cette protéine Ulk-1 est une protéine clé de l'autophagie et régule l'élimination des organelles sous le contrôle du complexe mTORC1 et d'AMPK (Alers et al., 2012; Kundu, 2011). Enfin, de récentes études ont mis en évidence l'importance de l'activation de NIX et de Ulk-1 au cours de la mitophagie des réticulocytes, une étape essentielle de l'érythropoïèse et du bon développement des cellules érythroïdes suggérant une coexistence de ces voies (Mortensen et al., 2010 ; Honda et al., 2014). Cette hypothèse est renforcée par la régulation des gènes *NIX* et *ULK1* par le facteur de transcription NF-E2. Les deux gènes d'autophagie sont des gènes cibles directs de NF-E2, retrouvés liés à NF-E2 lors d'expériences d'immunoprécipitation (Gothwal et al., 2016; Lupo et al., 2016).

Le réticulocyte perd également de manière progressive ses vacuoles, l'expression des récepteurs CD71 et CD36 ainsi que des intégrines telle que l'intégrine α4β1. Il remodèle la membrane plasmidique et change de forme. Toutes ces modifications nécessitent une fusion des vésicules avec la membrane plasmique puis leur externalisation (M. J. Koury et al., 2005). L'augmentation de l'élasticité, l'adaptation d'une nouvelle forme discoïdale biconcave ainsi que la réduction de la taille du globule rouge sont dues à des remaniements du cytosquelette (Kalfa et al., 2006). Les domaines lipidiques tels que les domaines enrichis en cholestérol et en sphingomyéline – tous deux présents dans des sites spécifiques à la vésiculation membranaire - ont une importance dans le remodelage de la membrane cytoplasmique (Leonard et al., 2017).

3. Caractéristiques phénotypiques au cours de la différenciation tardive

Divers marqueurs cellulaires permettent d'identifier les différents stades de différenciation des précurseurs érythroïdes (figure 8). Ainsi, au stade proérythroblaste, les cellules expriment à leur membrane la GPA et commencent à synthétiser l'Hb. Les cellules expriment également le marqueur CD36 et CD71 jusqu'au stade acidophile (Okumura, Tsuji, & Nakahata, 1992 ; Belaaloui et al., 2003).

L'équipe du Dr N. Mohandas a mis au point une technique de tri des précurseurs basée sur l'expression des marqueurs membranaires Band 3 et intégrine α-4. Alors qu'au cours de la différenciation érythroïde l'expression des principales protéines membranaires augmentent telles que GPA et Band 3, l'expression de la plupart des molécules d'adhésion diminue. Après avoir été triées sur la base de la GPA, les cellules positives sont ensuite triées en fonction de l'expression de Band 3 et de l'intégrine α-4 (J. Hu et al., 2013)(figure 8).

C. Les îlots érythroblastiques

Les îlots érythroblastiques uniformément distribués dans la moelle osseuse et dans le foie fœtal constituent l'unité structurale de la différenciation érythroïde terminale (Bessi, 1958 ; Breton-Gorius, Guichard, & Vainchenker, 1979). Ils sont composés d'un macrophage central autour duquel sont organisés les cellules érythroïdes à tous les stades de différenciation et ils soutiennent la maturation des érythroblastes (Chasis & Mohandas, 2008; Mohandas & Chasis, 2010) (figure 9). Cette structure assure la régulation de la croissance et de la différenciation érythroïde et l'élimination des noyaux. Elle assure la régulation de la mort cellulaire par apoptose. Le macrophage assure un rôle primordial dans la maturation terminale. Il permet d'endocyter le noyau et les diverses organelles expulsées par l'érythroblaste acidophile. L'absence de macrophage ou une altération de la différenciation des macrophages entraîne un important défaut de la différenciation érythroblastique (Sadahira & Mori, 1999; Sadahira et al., 1999). Ainsi les macrophages favorisent la prolifération et la survie des érythroblastes (Rhodes et al., 2008). De plus, deux études ont démontré que les macrophages jouaient un rôle important dans l'érythropoïèse *in vivo*, en particulier dans des conditions de stress érythropoïétique (Chow et al., 2013; Ramos et al., 2013).

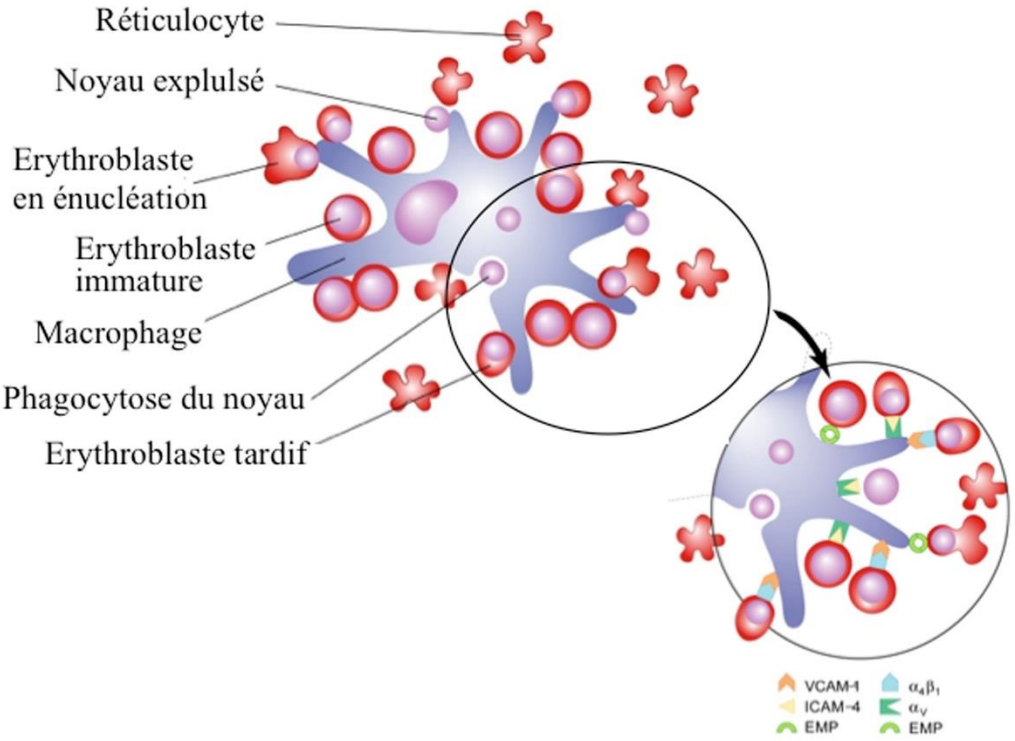


Figure 9 : Schématisation d'un îlot érythroblastique constitué d'érythroblastes à différents stades de maturation autour d'un macrophage médullaire.

La protéine Emp (Erythroblast Macrophage Protein) est la première molécule d'adhésion découverte comme permettant l'interaction entre le macrophage central et les autres cellules. Cette protéine de 36 kDa est exprimée à la surface du macrophage et des érythroblastes et est essentielle à la maturation des érythroblastes. L'absence de cette protéine induit une diminution de la prolifération, de la différenciation, du taux d'énucléation et un taux d'apoptose six fois plus élevé que la normale (Hanspal & Hanspal, 1994; Hanspal et al., 1998). De plus, les souris déficientes pour le gène codant cette protéine présentent une anémie sévère provoquant *in utero* une létalité due à un défaut de l'énucléation (Soni et al., 2006).

D'autres études ont montré le rôle de la protéine Rb (rétinoblastoma tumor suppressor) dans la maturation des macrophages et dans la différenciation érythroïde terminale. En effet, il a été montré que l'invalidation du gène codant cette protéine induisait une anémie létale chez la souris due à un défaut d'énucléation. L'absence de cette protéine dont la fonction principale est de réguler la transition entre la phase G1 et la phase S au cours du cycle cellulaire entraîne chez ces souris des dérégulations de l'expression du facteur de transcription Id2. Cela induit

une inhibition du facteur de transcription PU-1 et ainsi une altération de la maturation des macrophages (Iavarone et al., 2004). La protéine Rb joue également un rôle intrinsèque pendant la phase terminale de l'érythropoïèse lors de la phase d'arrêt du cycle cellulaire. Son absence induit une différenciation inefficace avec un blocage de l'érythropoïèse (Sankaran et al., 2008). Par ailleurs, le macrophage est aussi responsable de la phagocytose des noyaux et des organelles cytoplasmiques expulsés par les érythroblastes acidophiles. Cette phagocytose est causée par l'exposition des phosphatidylsérines à la surface des pyrénocytes et implique la DNAse II (Kawane et al., 2001).

Un certain nombre de couples de molécules d'adhésion entre le macrophage et l'érythroblaste ont été identifiés. D'une part, le couple formé par l'intégrine VLA-4 (intégrine α4β1), exprimée par les érythroblastes, et la protéine d'adhésion VCAM-1 (pour Vacular Cell Adhesion Molecule-1) exprimée par le macrophage (Sadahira, Yoshino, & Monobe, 1995), d'autre part, la sous-unité de l'intégrine α5 exprimée par le macrophage et la protéine d'adhésion ICAM-4 (Intracellular Cell Adhesion Molecule-1) (G. Lee et al., 2006) jouent un rôle dans la stabilité des îlots érythroblastiques via leur implication dans l'interaction macrophage-érythroblaste. Une inhibition de ces interactions donne lieu à une réduction des îlots érythroblastiques.

Enfin, les érythroblastes interagissent entre eux au sein des îlots érythroblastiques et participent au mécanisme de régulation négative de l'érythropoïèse. En condition physiologique, les progéniteurs érythroblastiques ainsi que les précurseurs immatures expriment le récepteur de mort FAS. Les érythroblastes matures expriment eux le ligand, FAS-L (De Maria et al., 1999). Ainsi, la cohabitation des cellules à différents stades de maturation permet de réguler la production des érythroblastes via l'interaction du complexe du récepteur de mort et de son ligand. Cette liaison induit l'apoptose des cellules immatures en excès.

Une récente étude, - cependant contestée - a mis en évidence que les macrophages présents au sein des îlots érythroblastiques expriment le récepteur à l'érythropoïétine (EPOR). Une injection d'EPO entraîne une augmentation à la fois de la quantité des macrophages des îlots érythroblastiques mais également leur qualité. Cela s'est également accompagné d'une expansion *in vivo* des érythroblastes. La même équipe a montré que ces macrophages exprimaient les facteurs de croissance IGF1, IL-18 et VEGFβ et a suggéré la possibilité que les macrophages de ces îlots puissent augmenter la prolifération érythroïde en sécrétant ces facteurs de croissance (W. Li et al., 2019) (figure 10). Le récepteur à IGF1 est exprimé dans les cellules

érythroïdes à tous les stades de développement alors que le récepteur à IL-18 est exprimé dans les progéniteurs érythroïdes (W. Li et al., 2019).

L'ensemble de toutes ces interactions au sein des îlots érythroblastiques contribue à son intégrité et affecte la maturation et/ou la différenciation des cellules.

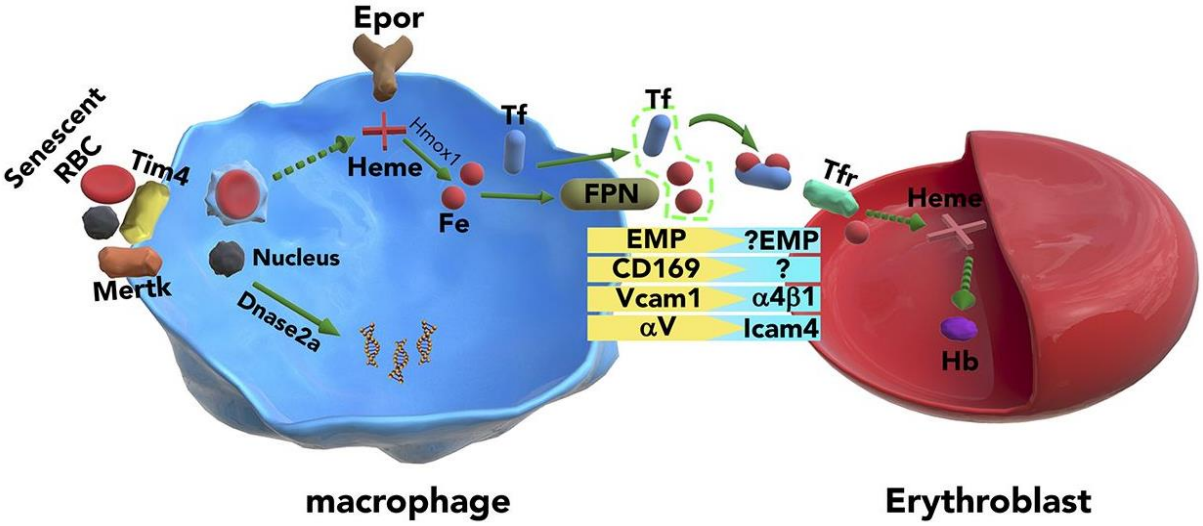


Figure 10 : Représentation des îlots érythroblastiques. Ils sont composés d'un macrophage central et de cellules érythroïdes et sont la première niche hématopoïétique découverte (W. Li et al., 2019).

III. Régulation de l'érythropoïèse

L'érythropoïèse est un processus dynamique dont l'environnement impacte sur son fonctionnement. Un réseau de voies de signalisation interconnectées est responsable de la production, de la distribution et du renouvellement des globules rouges (Valent et al., 2018). La différenciation érythroïde demande une régulation fine à plusieurs niveaux avec d'un côté des signaux extracellulaires provenant du micro-environnement (sécrétions de cytokines ou de facteurs d'adhérence) et d'un autre côté des signaux intra-cellulaires (les facteurs de transcription, les récepteurs aux facteurs de croissance et autres voies de signalisation).

A. Régulation de l'érythropoïèse par les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des glycoprotéines, agissant telles des hormones endocrines (hormones sécrétées dans le sang et ayant une action à distance du lieu de sécrétion) ou paracrine (hormones dont les cellules cibles sont localisées dans l'environnement proche du lieu de sécrétion). Les facteurs de croissance permettent la régulation positive ou négative des cellules de l'organisme. Dans le premier cas, ils favoriseront la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire alors que dans le second cas, ils induiront un arrêt de la prolifération et une apoptose des cellules. Les deux facteurs de croissance majeurs de l'érythropoïèse sont le SCF et l'EPO.

1. Régulation de l'érythropoïèse par l'érythropoïétine

a. Synthèse de l'érythropoïétine

Découverte en 1905 par Paul Carnot et Clotilde Deflandre, l'érythropoïétine (EPO) est une glycoprotéine d'une masse moléculaire de 18 kDa, et de 34 kDa lorsqu'elle est glycosylée - c'est-à-dire active – et est composée de 165 acides aminés (Miyake, Kung, & Goldwasser, 1977). Cette glycoprotéine de la famille des cytokines de types 1 possède une structure tridimensionnelle globulaire composée de quatre hélices α antiparallèles et amphipathiques. Cette hormone contient un motif de glycosylation constitué de quatre chaînes glycosylées : 3 sont des N-glycosylation situées sur des arginines en position Asn-24, Asn-38 et Asn-83 et une est une O-glycosylation sur une sérine en position Ser-126. Ce motif confère 40% de son poids moléculaire à la protéine (Sinclair, 2013). Il a été montré que cette distribution de la glycosylation avait une importance dans la cinétique de liaison entre l'EPO et son récepteur(Jiang et al., 2014).

Au cours du développement fœtal, l'EPO est uniquement produite dans le foie tandis qu'à l'âge adulte elle est synthétisée à 80% par les cellules péritubulaires interstitielles du rein (Koury et al., 1991 ; Lacombe & Mayeux, 1998). Des sites de productions secondaires ont été décrits localisés au niveau des cellules rétiniennes et des astrocytes (Ponce et al., 2013). En condition physiologique, la concentration d'EPO évolue inversement à celle de l'hémoglobine. Pour une concentration d'hémoglobine moyenne de 12 g/dl, celle de l'EPO circulante est proche de 20 UI/L. Cette dernière va augmenter en fonction de la baisse de la concentration d'Hb pour atteindre une valeur approchant 200 UI/L lorsque l'hémoglobine atteint 7 g/dl.

b. Fonction et régulation de l'érythropoïétine

Cette cytokine est principalement responsable de la prolifération, de la différenciation et de la maturation des cellules érythroïdes, aux stades embryonnaire, fœtal et adulte (Bunn, 2013). Les cellules rénales sont sensibles aux variations de la pression partielle du dioxygène (O_2). L'apport d'O_2 au niveau du rein inhibe la transcription du gène codant pour la protéine EPO. Ainsi la production des hématies n'est plus stimulée par la cytokine. A l'inverse, en situation d'hypoxie – c'est-à-dire une pression partielle en O_2 basse – la transcription du gène est activée, l'EPO est synthétisée et la production des hématies via l'activation de l'érythropoïèse est de nouveau stimulée. L'induction du gène codant la protéine EPO est donc hypoxie-dépendante (figure 11). Elle est contrôlé par fixation des facteurs de transcription ubiquitaires HIF (Hypoxia Inductible Factor) sur la séquence régulatrice HRE (Hypoxia Response Element) du gène *EPO* présente en sa partie 5', au niveau du promoteur du gène (Wenger, 2002). Deux types de protéines constituent les complexes hétérodimériques HIF : les protéines HIF-α (HIF-1α ET HIF-2α) et HIF-β. En condition de normoxie, les protéines HIF-α sont hydroxylées par des prolylhydroxylases et ubiquitinylées par la protéine pVHL (Von Hippel Lindau) induisant leur dégradation par le protéasome. De plus, la protéine FIH-1 (Factor Inhibiting HIF-1), inhibitrice de la protéine HIF-1, est activée et bloque la transcription de l'EPO dans le noyau. En condition hypoxique, FIH-1 est inhibée et HIF-1α n'est plus hydroxylée par PHD2 augmentant ainsi sa stabilité cytoplasmique. La sous-unité α est transloquée dans le noyau et se lie à la sous-unité β de HIF exprimée constitutivement pour former un dimère fonctionnel HIF-1. En présence du cofacteur p300/CBP, le dimère HIF-1 nouvellement formé se lie à la séquence HRE et initie la transcription de l'EPO (Wenger, 2002).

Il a été démontré que HIF activait également un certain nombre de gènes impliqués dans le métabolisme du fer tel que l'absorption et le transport du fer. Ces activations ont pour résultats la stimulation de la production endogène de l'EPO pour une activation de l'érythropoïèse, une augmentation de la disponibilité du fer à partir des macrophages et des entérocytes et la maturation des érythrocytes (Haase, 2013). La stabilisation de ces gènes donne lieu à une augmentation de la protéine exportatrice de fer : la ferroportine (Taylor et al., 2011); de la ceruloplasmine, une oxydase du fer (Mukhopadhyay, Mazumder, & Fox, 2000) et de l'hème oxygénase qui catabolise l'hème (P. J. Lee et al., 1997). Tout cela permet ainsi l'adaptation et la survie de l'organisme en condition hypoxique.

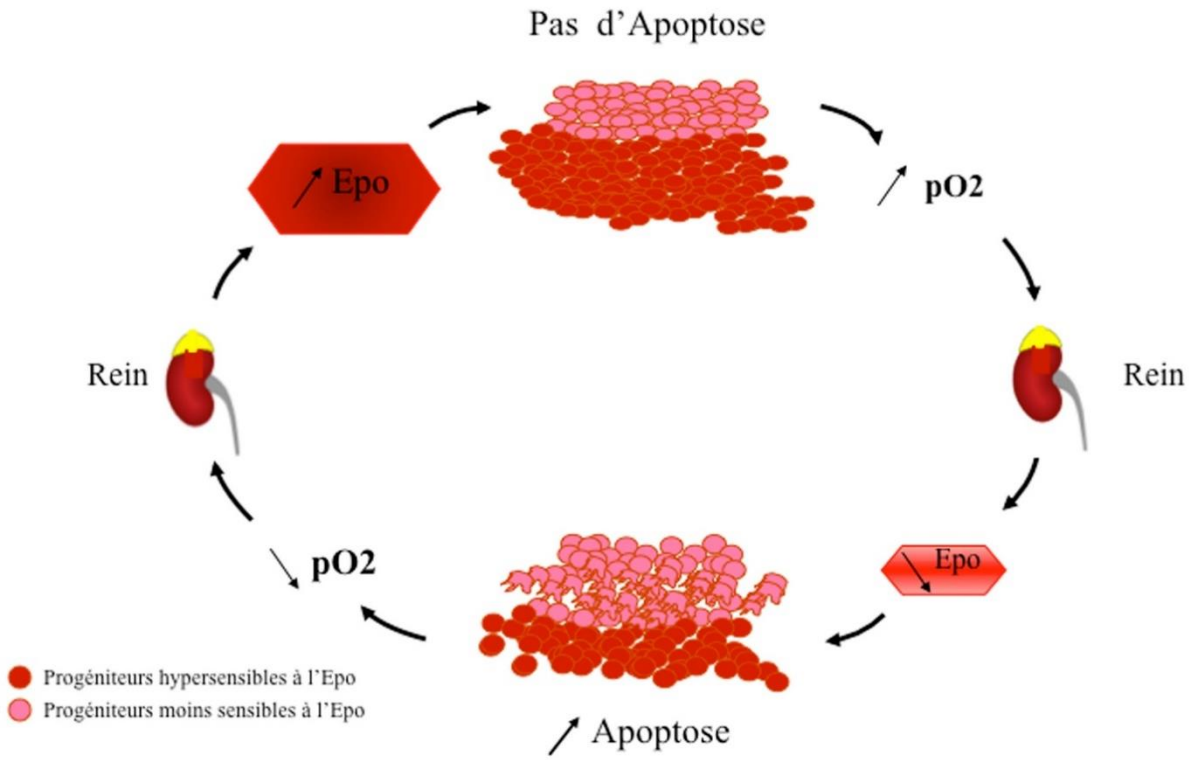


Figure 11 : Régulation de l'érythropoïèse par l'hypoxie et l'EPO. (Schéma d'après (Y. Zermati et al., 2003)

L'EPO est donc une cytokine essentielle pour l'érythropoïèse. Quand sa concentration est basse, les progéniteurs et les précurseurs érythroïdes meurent par apoptose (M. Koury & Bondurant, 1990). En effet, la liaison entre EPO et EPOR interfère avec le FAS-L. La différenciation érythroïde terminale est activée en arrêtant l'apoptose des cellules progénitrices érythroïdes (X. Yu et al., 2002). Le récepteur à l'érythropoïétine (EPOR) est exprimé par les érythroblastes dès les stades BFU-e matures et CFU-e jusqu'au stade d'érythroblaste acidophile. Les stades de différenciation depuis les CFU-e sont également dits EPO-dépendants. Il a été démontré en 2013 que la voie de signalisation médiée par l'interaction entre l'EPO et son récepteur était indispensable à la maturation des cellules de l'érythropoïèse précoce (Malik et al., 2013).

c. Le récepteur à l'érythropoïétine

Le récepteur à l'érythropoïétine (EPOR) est une glycoprotéine de 507 acides aminés (D'Andrea, Lodish, & Wong, 1989) et d'une masse moléculaire initiale de 52 kDa, qui, une fois glycosylée possède un poids moléculaire de 66 kDa (Jones et al., 1990). Ce récepteur dimérique transmembranaire appartient à la superfamille des cytokines de types I (Bazan, 1989). Comme tous les membres de cette famille, EPOR est divisé en trois domaines (McCaffery et al., 1989) : extracellulaire, transmembranaire et cytoplasmique. Le domaine extracellulaire est composé de 223 acides aminés, de deux domaines Ig-like, de résidus cystéines conservés - permettant la formation de ponts disulfures impliqués dans la dimérisation du récepteur – de groupement aromatique et d'un motif SWXWS – jouant un rôle dans le repliement du récepteur (Youssoufian et al., 1993). Le domaine extracellulaire est indispensable pour l'expression à la membrane du récepteur et son internalisation. Il comporte 2 domaines fonctionnels D1 – impliqués dans la dimérisation du récepteur – et D2 – impliqué dans la conformation du récepteur à la surface. Ces deux domaines permettent la liaison de l'hormone EPO à l'EPOR ainsi que la transduction du signal (Yoshimura et al., 1992 ; Livnah et al., 1996;).

Le gène *EPOR* est régulé via une séquence promotrice contenant les séquences consensus fixant les protéines GATA-1 et SP-1 (Zon et al., 1991). L'interaction entre la protéine EPO et son récepteur induit un changement de conformation de ce dernier. Les deux domaines intracellulaires du récepteur se rapprochent et induisent l'activation de la kinase JAK2. En effet, la phosphotyrosine JAK2 située dans la région juxta-membranaire va s'autophosphoryler au niveau de ses résidus tyrosines 1007 et 1008 (Witthuhn et al., 1993), et jouer un rôle dans la phosphorylation des huit tyrosines du domaine intracellulaire d'EPOR. La protéine JAK-2 est l'unité catalytique d'EPOR. Elle est nécessaire à son activation. Des études chez la souris ont montré qu'une invalidation pour EPOR induit le même phénotype que celui de l'invalidation de JAK-2 (Neubauer et al., 1998). JAK-2 n'est pas la seule kinase à phosphoryler l'EPOR. D'autres kinases (Lyn, Btk) sont recrutées et phosphorylent les 8 résidus tyrosines intracellulaires du récepteur. Ces phosphorylations vont permettre le recrutement de divers effecteurs à domaines SH2 (Richmond et al., 2005) :

- Les protéines à signaux de transduction activateurs de transcription STAT5 et STAT3
- Les phosphatases SHIP1 et SHIP2
- Les enzymes modifiant les lipides SHIP, la sous-unité p85α de la PI3K et PLCγ

- Les protéines adaptatrices CrkL, Cvl, Shc, IRS-2, CIS, Grb2, GAB1 et GAB2
- Les tyrosines kinases Syk et Tec
- La protéine suppressive de signal SOCS3 (suppressor of cytokine signaling)

La liaison entre la protéine EPO et son récepteur EPOR activent différentes cascades de signalisation incluant le transducteur de signal et l'activateur de la transcription 5 (STAT-5), la phosphoinositol 3'-kinase (PI3K), la protéine kinase activée par un mitogène (MAPK) et la protéine kinase C (PKC) (Birkmann et al., 1997). La fixation de l'EPO sur EPOR induit donc les voies JAK2/STAT5, PI3K/Akt, RAS/MAPK et une régulation du calcium intracellulaire. La demi-vie du récepteur est de 90 minutes. Sa phosphorylation en réponse à la liaison avec son ligand est transitoire pour une durée d'environ 30 minutes (Miura et al., 1991 ; Linnekin et al., 1992).

d. Les différentes voies de signalisation du récepteur EPOR (figure 12)

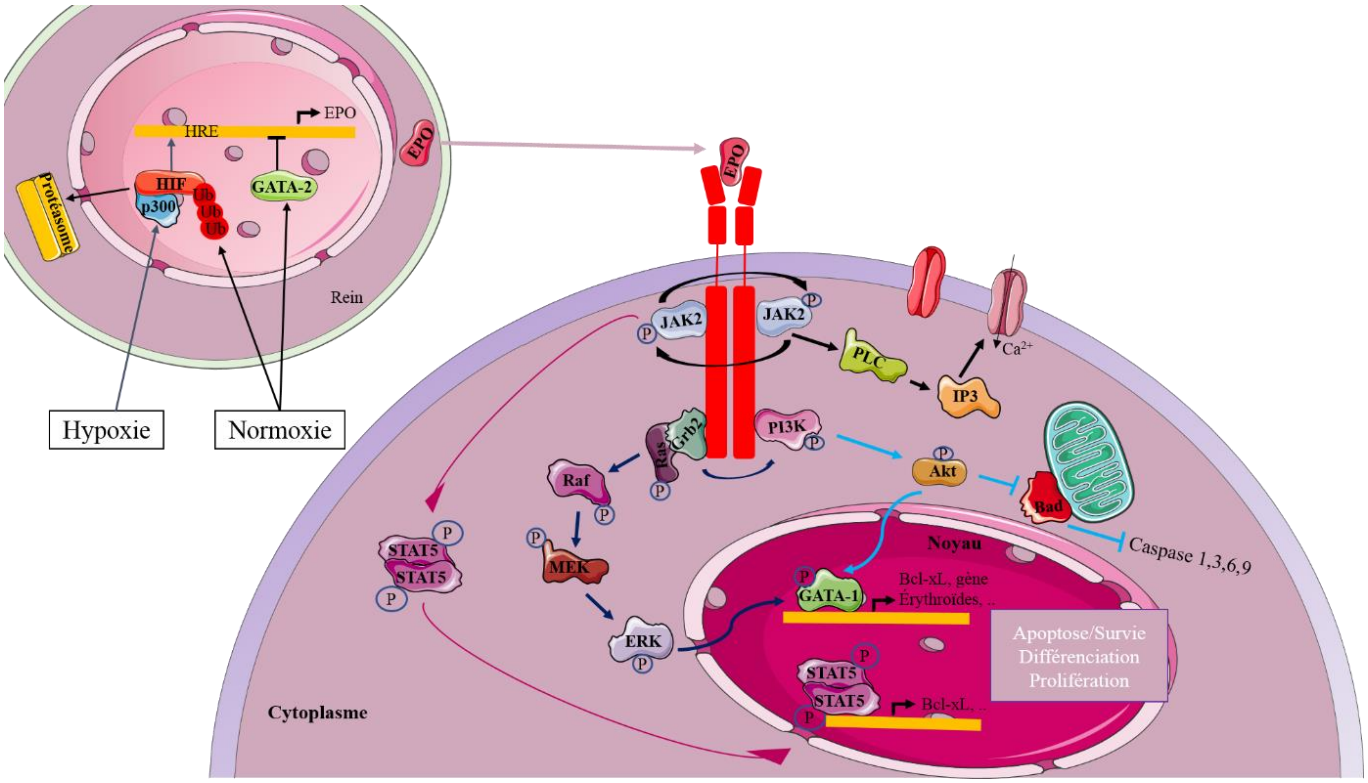


Figure 12 : Illustration des voies de signalisation de l'érythropoïétine. En condition de normoxie le facteur de transcription HIF est ubiquitinylé (Ub) puis dégradé par le protéasome déstabilisant ainsi la liaison HIF/p300. En parallèle, le facteur GATA-2 se fixe au niveau du promoteur du gène EPO afin d'inhiber sa transcription. En condition d'hypoxie, de par sa liaison avec son co-activateur p300, HIF stimule la transcription du gène EPO via des interactions avec des séquences HRE (Hypoxia response element). L'EPO ainsi produite au niveau du rein est sécrétée dans le sang pour atteindre ses cellules cibles présentant son récepteur à leur surface. L'interaction entre l'EPO et son récepteur peut activer plusieurs voies de signalisations telles les voies MAPK, JAK2/STAT5, PLC/IP3 ou PI3K/AKT. Ces voies régulent l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose et la survie cellulaire, la différenciation ou la prolifération comme Bcl-xL (Adapté de (Chateauvieux et al., 2011) et de (Mastromarino et al., 2011)

- La voie JAK2/STAT5/Bcl-xL

Le récepteur EPOR ne possède pas d'activité enzymatique propre. A sa sortie du réticulum endoplasmique, la forme immature du récepteur se lie à la kinase JAK2 (L. J. shen Huang, Constantinescu, & Lodish, 2001) permettant son repliement et son transport à la membrane plasmique.

La protéine kinase JAK2, appartenant à la famille des Janus Kinases (JAK) est constituée de sept domaines protéiques nommés JH (JAK Homology) dont 3 sont très conservés. Le domaine kinase JH1, porteur de l'activité catalytique, et le domaine pseudo-kinase JH2, porteur d'une région régulatrice négative, sont localisés en C-terminal du domaine intracellulaire du récepteur. En N-terminal, les domaines JH3 à JH7 forment un domaine FERM permettant la liaison entre l'EPOR et JAK2. Cette liaison se réalise au niveau du réticulum endoplasmique et est indispensable à la translocation de l'EPOR à la membrane plasmique. La fixation du ligand sur son récepteur induit une activation de EPOR et de JAK2 qui va phosphoryler les tyrosines du récepteur. Cette action donne lieu au recrutement de protéines à domaine SH2 impliquées dans la transduction des signaux cytokiniques. Parmi ces protéines, les protéines STATs (Signal de Transduction Activateur de Transcription) localisées dans le cytoplasme (DeBerry, Mou, & Linnekin, 1997 ; Gotoh et al., 1996 ; Ryan et al., 1997) se fixent au récepteur puis se phosphorylent induisant ainsi leur homodimérisation (Brizzi et al., 1999) et leur activation. Dès lors, ces dimères sont transloqués dans le noyau où ils vont initier la transcription de plusieurs gènes – tels que *c-MYC, BCL-xL* ou *c-FOS* – impliqués dans la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire et l'apoptose.

Les protéines STATs ont une structure moléculaire très conservée au cours de l'évolution. Elles possèdent un domaine de liaison à l'ADN qui reconnait la séquence consensus nommée GAS (Interferon-Gamma Activated Sequence) (ou TTC(N)3GAA), un motif SH2 essentiel à l'activation de la protéine et un domaine de transactivation. Trois des sept membres de la famille STATs jouent un rôle dans la signalisation par la voie EPO/EPOR : STAT, STAT3 et STAT5 (Halupa et al., 2005). Cette dernière est le membre de la famille le mieux caractérisé dans l'érythropoïèse. Elle possède deux isoformes : STAT5a et STAT5b (Quelle et al., 1996) activés par cytokines et plusieurs facteurs de croissance. La protéine STAT5 possède plusieurs fonctions. Entre autres, elle régule l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines régulatrices du cycle cellulaire : les cycline G2 et D2, les protéines p27 et p21 (J. Fang et al.,

2007). De plus, elle joue un rôle dans l'activation de facteurs anti-apoptotiques comme Bcl-xL (Socolovsky et al., 1999), Pim-1 et Pim-3, Serphin-3G, Trb3, Irs-2 (Sathyanarayana et al., 2008). Impliquée dans la synthèse de l'hème et nécessaire à la survie des précurseurs érythroïdes, l'expression de Bcl-xL est augmentée durant la phase terminale de l'érythropoïèse empêchant ainsi l'apoptose par inhibition de la voie des caspases (Motoyama et al., 1999 ; Hafid-medheb et al., 2003 ; Testa, 2004). Le promoteur du gène *BCL-XL* possède plusieurs régions régulatrices correspondant aux séquences de liaison à l'ADN de plusieurs facteurs de transcription tel que GATA-1 (Grillot et al., 1997). En absence d'EPO, la caspase 3 est activée et clive GATA-1 et Bcl-xL induisant une entrée en apoptose des cellules. L'inactivation du récepteur de l'EPO mène à l'inhibition du clivage de la protéine Bcl-xL par cette caspase (Testa, 2004). Des études ont démontré que les érythroblastes des souris invalidées pour les deux isoformes de STAT5 présentaient une diminution de l'expression de Bcl-xL et un taux d'apoptose élevé (Socolovsky et al., 1999). *In utero*, ces souris meurent du fait d'une anémie sévère et de graves anomalies du système nerveux central (Socolovsky et al., 1999). Inversement, une expression constitutivement active de STAT5 dans des lignées cellulaires induit une prolifération érythroïde indépendante des cytokines (Garçon et al., 2006; Onishi et al., 1998; Santos et al., 2001). De même, une surexpression de Bcl-xL dans des lignées cellulaires ou des cellules primaires entraîne une différenciation érythroïde indépendante à l'EPO comme c'est le cas pour la maladie de Vaquez (Dolznig et al., 2002; Garçon et al., 2006). Tous ces éléments montrent que ce processus est parfaitement régulé.

Les protéines STATs peuvent être également activées par les deux autres kinases capables de se lier à l'EPOR : la tyrosine kinase Lyn (Lck/Yes-related novel tyrosine Kinase) (Chin et al., 1998) et Btk (Bruton's tyrosine Kinase) (Schmidt et al., 2004). Des études chez des souris $Lyn^{-/-}$ ont montré i) que leurs érythroblastes n'exprimaient pas les facteurs de transcription GATA-1 et EKLF (Erythroïd Krüppel-Like Factor), tous deux jouant un rôle important dans l'érythropoïèse et ii) une diminution de l'expression de STAT5. Ces souris présentaient une anomalie de la différenciation érythrocytaire bloquée aux stades BFU-e et CFU-e ainsi qu'une anémie (Ingley et al., 2005). Les études portant sur les souris $Btk^{-/-}$ ont montré que bien que viables, leurs progéniteurs érythroïdes affichaient une diminution à la fois dans la phosphorylation de l'EPOR et de JAK2 ainsi qu'une diminution de la réactivité à l'EPO. De plus, l'expansion des progéniteurs érythroïdes est altérée en condition de concentrations limitantes de SCF et d'EPO (Schmidt et al., 2004).

- **La voie Phosphoinositide 3-kinase et la protéine kinase B**

La voie PI3kinase/Akt peut moduler la survie, le métabolisme, la traduction protéique. Elle est une des voies de signalisation sous-jacente de l'EPOR.

La phosphoinositide 3-kinase (PI3K) est un hétérodimère constitué d'une sous-unité régulatrice et d'une sous-unité catalytique, nommées respectivement p85 et p110. L'EPOR peut activer la voie PI3 kinase soit en recrutant la sous-unité régulatrice de la protéine soit par l'intermédiaire des protéines adaptatrices GAB1 (GRB2 Associated Binding Protein 1), GAB2 (GRB2 Associated Binding Protein 2), IRS-2 (Insulin Receptor Substrate 2), Cbl (Casitas B-lineage Lymphoma) et VAV (un proto-oncogène) (Constantinescu et al., 1999 ; Klingmüller, 1997 ; Lecoq-Lafon et al., 1999). L'activation de la PI3K par l'EPO dans les progéniteurs érythroïdes mène à une augmentation de l'expression des cyclines D3, E et A et à la transcription puis traduction du récepteur Kit (c-kit, CD117) (Sivertsen et al., 2006). De plus, l'activation de la PI3K permet la phosphorylation de la protéine PIP_2 (Phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphate) devenant le messager secondaire PIP_3 (Phosphatidyl-inositol-4,5-triphosphate). Ce dernier interagit et active une sérine/thréonine kinase Akt (ou PBK pour Protein Kinase B) via son domaine PH (Pleckstrin Homology).

Dès lors qu'elle est activée, Akt va réguler l'expression de nombreux effecteurs impliqués dans la survie et la prolifération des cellules érythroïdes.

Premièrement, Akt peut réguler l'expression de protéines pro ou anti-apoptotiques. Elle peut phosphoryler la protéine pro-apoptotique Bad (Bcl-2-associated death promotor protein) la dissociant ainsi des complexes auxquels elle appartient. En effet, en absence de signaux de survie, Bad neutralise les protéines anti-apoptotiques présentent dans le cytoplasme comme Bcl-xL (E. Yang et al., 1995). Lorsqu'elle est phosphorylée, Bad ne séquestre plus la protéine Bcl-xL qui va alors empêcher l'apoptose en inhibant la voie des caspases (Shen et al., 2010). Cette voie a la particularité de pouvoir être activée par deux processus : l'interaction EPO/EPOR ainsi que celle du SCF à son récepteur c-Kit. Dans le même esprit, la protéine Akt engendre une inactivation des caspases 3 et 9 et active la protéine survivine. Cette dernière appartient à la famille des inhibiteurs d'apoptose et inhibe l'activité des caspases (Leung et al., 2007). Enfin, l'inhibition de la protéine kinase GSK3 (Glycogen Synthetase Kinase 3) par Akt protège les érythroblastes de l'apoptose même en absence d'EPO (Somervaille, Linch, & Khwaja, 2001).

Deuxièmement, Akt régule également des facteurs de transcription. C'est pourquoi le facteur de transcription FOXO3a (anciennement FKHR-L1) appartenant à la famille des « Forkhead box » voit son activité transcriptionnelle pro-apoptotique inhibée lors de sa phosphorylation par Akt (Brunet et al., 1999 ; Kashii et al., 2000). FOXO3a a pour cibles les gènes pro-apoptotique *FAS-L* et *BIM* (Bcl-2-like protein11) (Gilley, Coffer, & Ham, 2003) et des gènes régulateurs du cycle cellulaire comme *p27KIP1* ou *BTG1* (B cell Translocation Gene 1). Une fois phosphorylée, FOXO3a est séquestrée dans le cytoplasme par les protéines 14.3.3 et ne peut plus pénétrer dans le noyau où il initie la synthèse de ses protéines cibles favorisant ainsi la survie cellulaire (Engström, Karlsson, & Jönsson, 2003). De plus, Akt peut cibler le facteur de transcription GATA-1 et augmenter son activité transcriptionnelle par phosphorylation favorisant ainsi la différenciation érythroïde (Kadri et al., 2005).

La dernière cible de la protéine Akt dans le processus érythroïde est l'enzyme iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase). Akt favorise l'expression de iNOS qui inhibe la NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate H^+). La NAPDH joue un rôle dans les mécanismes de protection et est responsable de la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Mastromarino et al., 2011).

- **La voie RAS-MAP Kinase**

L'activation de la signalisation RAS-MAPK (MAP Kinase) est possible par deux voies après stimulation par l'EPO. De manière directe, la voie est activée via la protéine Grb2 (Growth factor recptor-bound protein 2) pouvant se lier à la kinase JAK2 grâce à son domaine SH2. La fixation de Grb2 peut également être indirecte par interaction avec les tyrosines phosphatase SHC et SHP2. Ces deux mécanismes entraînent une cascade d'activation débutant par la translocation dans le cytoplasme de la protéine SOS (Son of Sevenless). SOS est un facteur d'échange nucléotidique. Il permet le remplacement de la GDP – liée à la GTPase membranaire RAS, par une molécule de GTP entraînant ainsi l'activation de la protéine Ras. La protéine Ras est présente sous forme de 3 homologues mais c'est la forme K-Ras qui joue un rôle dans l'érythropoïèse. Ainsi par cascades, K-Ras induit la phosphorylation et l'activation de la sérine/thréonine kinase Raf1 qui à son tour va phosphoryler les kinases MAPK1 et MAPK2 (MAP-Kinase Kinase), les activateurs des protéines kinases ERK 1 et 2 (Extracellular Regukated Kinase 1 et 2 ou 942/p44) (Herbst et al., 1991). Une fois phosphorylées, les protéines

ERK1 et 2 vont induire l'activation de différents facteurs de transcription comme c-fos ou Elk1. La voie ERK joue un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire. Durant la phase précoce de l'érythropoïèse, ERK 1 et 2 favorisent la prolifération des progéniteurs érythroïdes immatures au détriment de leur différenciation terminale (Sui et al., 1998). Il semblerait que les protéines ERK contrôlent également l'activité des caspases et le maintien de l'expression Bcl-xL (Mori et al., 2003). Cependant, l'activation des kinases ERK1 et 2 reste cellule et tissu dépendante. En effet, des études menées en 2004 montrent que leur activation dans les CSHs ainsi que dans les progéniteurs hématopoïétiques est médiée par la voie PI3K puis au cours de la différenciation par la voie MAP-Kinase (Wandzioch et al., 2004).

L'activation de la protéine kinase K-Ras stimule également le complexe protéine kinase SAPK (Stress-Activated Protein Kinase) / Jnk (Jun Kinase). Puis la sérine/thréonine kinase Jnk active, par phosphorylation, la protéine c-Jun qui avec la protéine c-Fos forment le complexe transcriptionnel AP-1 (Activator protein 1). Lorsque la cellule n'est pas privée de facteurs de croissance, le complexe AP-1 régule des gènes impliqués dans le cycle cellulaire et favorise de ce fait la prolifération. L'expression de *c-Jun* dans les cellules érythroïdes retarde l'apoptose (Shimizu et al., 1996). Ainsi la voie SAPK/Jnk joue un rôle dans la survie cellulaire et la prolifération des progéniteurs érythroïdes immatures (Jacobs-Helber & Sawyer, 2004).

Enfin après phosphorylation des kinases MAP2K3 ou MAP2K6 par K-Ras, la protéine MAPK p38 est phosphorylée sur ses résidus thréonine 180 et tyrosine 182 (Derijard et al., 1995) et induira une activation de facteurs de transcription tel que ATF-2 (Gupta et al., 1995) dont le rôle oncogénique a été démontré (Yamasaki et al., 2009). Des études ont également montré que la protéine p38 pouvait induire une apoptose suite à l'activation de la caspase 3 par la protéine p53 (Cheng et al., 2001).

- **La voie de régulation du calcium intracellulaire**

Le calcium est impliqué dans la prolifération et la différenciation cellulaire. En particulier, l'absorption du calcium contribue à la différenciation et à la prolifération des cellules érythroïdes aux stades BFU-e et CFU-e (Miller, Cheung et al., 1989). Il module l'expression de proto-oncogène comme c-MYC, phosphoryle des facteurs de transcription et active la calcineurine qui possède un effet anti-apoptotique (Richmond et al., 2005). L'activation du récepteur EPOR entraîne une entrée calcique dans la cellule par l'importateur

TRPC2 (Transient Receptor Potential Cation Channel 2), très exprimé à la surface des érythroblastes. Cette voie de régulation passant par la PLC (Phospholipase C) requiert l'IP3 (Inositol 1,4,5-triphosphate). L'importateur de calcium TRPC2 possède un récepteur à l'IP3 (Tong, Zhang, & Lodish, 2005).

e. La régulation négative de la signalisation EPO/EPOR

Bien que l'activation de l'EPOR par sa liaison avec son ligand EPO induise une activation de plusieurs voies de signalisation, de nombreux mécanismes de régulation négative se mettent rapidement en place. Ils permettent d'éviter une production excessive des globules rouges. Ces mécanismes consistent principalement à l'inactivation, l'internalisation et la dégradation du récepteur par diverses protéines.

Inactivation du récepteur à l'EPO

- **Rôle des protéines SOCS**

Les protéines de la famille SOCS (Suppressor Of Cytokine Sugnaling protein) sont impliquées dans la régulation négative de l'EPOR. Elles possèdent un domaine « SOCS box » et un domaine SH2 central permettant une interaction avec des résidus tyrosines phosphorylés. A l'état basal, l'expression des gènes *SOCS* est faible. Leur expression protéique est rapidement régulée en réponse à diverses cytokines – telles que EPO, IL-2, IL-3, IL-6, IFNα – ou hormones (hormone de croissance et prolactine) (Matsumoto et al., 1997 ; Gouilleux et al., 1995). Les protéines SOCS-1, SOCS3 et CIS (Cytokine-Iduced STAT inhibitor) suppriment le signal de prolifération envoyé par les cytokines anti-apoptotiques. La transcription des gènes codant ces protéines est sous le contrôle des STATs formant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif lors de l'activation de la voie EPO/EPOR. Des travaux sur des érythroblastes primaires ont mis en évidence une liaison de la protéine SOCS-3 à la protéine JAK2 phosphorylée (Sasaki et al., 1999) bloquant partiellement la signalisation de l'EPOR. Cette liaison va permettre sa seconde liaison à la tyrosine 401 du récepteur à l'EPO bloquant efficacement l'activation de ce dernier (Sasaki et al., 2000). La protéine SOCS-3 inhibe également l'activation de la kinase JAK2 par une fixation sur son site catalytique qui induit la dégradation de JAK2 par le protéasome. Le

rôle des SOCS passe par l'ubiquitinylation de ses protéines cibles provoquant une dégradation par le protéasome. Pour cela, les protéines SOCS recrutent sur leurs domaines « SOCS box » des protéines composant le complexe d'ubiquitinylation (élongine B et C/Cul5 ou Cul2/Roc1.pVHL). SOCS-1 et SOCS-3 sont aussi régulées par l'activation de l'EPOR. Perdant leur liaison avec les élongines après avoir été phosphorylées par JAK2, elles vont être dégradées par le protéasome à leur tour. Quant à la protéine CIS, elle régule négativement la voie JAK2/STAT en agissant tel un compétiteur direct de STAT5 (Matsumoto et al., 1997). La protéine CIS réprime ainsi la prolifération (Sasaki et al., 2000).

- **Les protéines tyrosines phosphatases**

Plusieurs tyrosines phosphatases permettent une déphosphorylation rapide du récepteur EPOR. Parmi ces enzymes, la protéine SHP-1 (Src Homology-2 containing Phosphatase-1) joue un rôle prédominant. SHP-1 possède un domaine SH2 (Klingmüller et al., 1995) interagissant avec le résidu tyrosine 429 phosphorylé de l'EPOR. Cette action entraîne une déphosphorylation du récepteur et de de la protéine JAK2. La liaison SHP-1 à l'EPOR ne s'effectue pas en absence de ce résidu de tyrosine prolongeant ainsi l'activation de JAK2 et une augmentation de la prolifération des progéniteurs érythroïdes. Cette absence de liaison conduit à une hypersensibilisation des cellules à l'EPO pouvant conduire à des érythrocytoses (Klingmüller et al., 1995). Des polyglobulies peuvent également apparaître en présence de mutation sur l'EPOR menant à la perte de cette liaison (de la Chapelle et al., 1993).

- **La protéine Lnk**

La protéine adaptatrice Lnk est impliquée dans la signalisation des récepteurs de cytokines tels que c-kit et EPOR en les inhibant. Elle est constituée de deux domaines d'interactions protéiques. En N-terminal, elle possède un domaine riche en proline PH alors qu'en C-terminal elle possède un domaine SH2 indispensable à sa fonction inhibitrice (Rudd, 2001). Suite à l'activation de l'EPOR, la protéine Lnk est phosphorylée sur une tyrosine puis inhibe à son tour la phosphorylation du récepteur EPOR. Cette action entraîne une inhibition des voies de signalisation en aval telle que la voie JAK2/STAT. Lnk recrute également des

inhibiteurs de JAK2 comme SOCS ou SHP1. En fixant JAK2, Lnk maintient un état inactif de la protéine JAK2 en lui induisant un changement de conformation. Une invalidation de Lnk mène à une augmentation quantitative des progéniteurs érythroïdes (L. Velazquez et al., 2002). Inversement, une surexpression de la protéine Lnk induit une inhibition de la différenciation terminale des cellules érythroïdes et une apoptose massive (Tong et al., 2005).

- **Les protéines PIAS (protein inhibitor of activated STATs)**

Présentes constitutivement dans la cellule, les PIAS peuvent réguler négativement l'activité de l'EPO-R via une liaison aux STATs. Cette liaison va entraîner l'inhibition de leur activité transcriptionnelle via une inhibition de leur fixation à l'ADN (Starr & Hilton, 1999) En outre, les PIAS peuvent interagir avec EKLF et induire une répression de son expression. Il a été montré qu'une interaction entre EKLF et PIAS fournit un nouveau mode de régulation de l'activité d'EKLF en absence de sumoylation et une implication des protéines PIAS dans l'érythropoïèse (Siatecka et al., 2015).

Dégradation de l'EPOR

La dégradation du récepteur EPOR est rapide et est réalisée par deux systèmes protéolytiques. L'un se déroule à la surface de la membrane et requiert une activation de la protéine JAK2. Le second est indépendant de l'activation ou de la présence de JAK2 et va entraîner une internalisation du couple EPO/EPOR suivi de sa dégradation par les lysosomes. Le premier système implique une ubiquitinylation par l'intermédiaire de la protéine β-Trcp (Beta Transducing repeat-containing protein) en C-terminal d'EPOR. Cette action va mener à la dégradation par le protéasome du récepteur (Meyer et al., 2007). La partie extracellulaire et transmembranaire d'EPOR va ensuite être internalisée et dégradée par les protéases des lysosomes. La seconde voie de dégradation est possible uniquement en présence d'une protéine JAK2 active, sur l'EPOR internalisé (Beckman et al., 1999). Si tel n'est pas le cas, il y aura un recyclage et une représentation à la membrane d'EPOR (Verdier et al., 2000; Walrafen et al., 2005 ; Meyer et al., 2007).

2. Régulation de l'érythropoïèse par le Stem Cell Factor et son récepteur c-kit

a. Synthèse du Stem Cell Factor

Le Stem Cell Factor (SCF) également appelé MGF (Mast-cell Growth Factor) ou KIT-LG (KIT-Ligand) fut caractérisé dans les année 1990 (Anderson et al., 1991; E. Huang et al., 1990; Williams et al., 1990; Zsebo et al., 1990). Il s'agit d'une cytokine produite ubiquitairement, synthétisée principalement par les cellules stromales, les cellules endothéliales, les cellules de Sertoli, les fibroblastes et les adipocytes (B. O. Zhou et al., 2017). Le SCF existe sous deux isoformes : une isoforme transmembraire de 248 acides aminés et une isoforme soluble de 165 acides aminés issue de modification post-transcriptionnelle (Brannan et al., 1991; Flanagan, Chan, & Leder, 1991). Au cours de l'érythropoïèse, le SCF membranaire (mSCF) induit une activation plus longue et efficace de son récepteur cible par rapport au SCF soluble (sSCF) qui produit une activation transitoire et va favoriser la dégradation du récepteur (Langley et al., 1993 ; Hsu et al., 1997;). Le gène codant pour la protéine est localisé sur le chromosome 12 (Zsebo et al., 1990) et est composé de 8 exons. À la suite d'un épissage alternatif de l'exon 6, le même gène peut donner les deux isoformes de SCF. Des expériences menées chez la souris ont montré qu'une homozygotie pour ce gène provoquait une mort *in utero* ou dans la période périnatale à la suite d'une anémie sévère alors qu'une hétérozygotie est viable mais conduit à une anémie macrocytaire, une infertilité et une dépigmentation cutanée (piébaldisme) (Nocka et al., 1989; Zsebo et al., 1990). Ces résultats ainsi que d'autres études ont permis de suggérer un rôle de l'axe SCF et de son récepteur c-kit dans l'hématopoïèse en favorisant la survie et la prolifération, en régulant la différenciation de diverses cellules souches et progénitrices hématopoïétiques y compris les cellules de la lignée érythroïde (Domen & Weissman, 2000; Kondo, Weissman, & Akashi, 1997; Toksoz et al., 1992; Wu et al., 1997).

b. Le récepteur du SCF : c-kit

La cytokine SCF est le ligand naturel du récepteur c-kit (CD117) cloné pour la première fois en 1987 (Yarden et al., 1987). Le récepteur est codé par un gène de 21 exons localisé sur le chromosome 4 (Giebel et al., 1992). La protéine c-kit appartient à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase de classe III (RTK III). Il s'agit d'un récepteur transmembranaire de 97 acides aminés dont la forme mature obtenue après 10 N-glycosylation a une masse moléculaire de 145 kDa. La protéine glycosylée présente quatre domaines :

- Un domaine extracellulaire comprenant 10 sites de N-glycosylations localisés à proximité du domaine transmembranaire et 5 domaines Ig-like (Immunoglobuline-like) situé en N-terminal. Des études de cristallographie ont permis de caractériser la fonction de ces domaines: les trois premiers sont dédiés à une reconnaissance et une fixation du SCF et les deux derniers sont impliqués dans le processus d'hétérodimérisation du récepteur (Yuzawa et al., 2007; Zhang, et al., 2000).
- Un domaine transmembranaire constitué de 23 acides aminés formant une hélice hydrophobe permettant l'ancrage du récepteur à la membrane plasmique.
- Un domaine juxtamembranaire contenant plusieurs résidus tyrosine servant de point d'ancrage aux protéines de signalisation en aval du récepteur. Lorsque le récepteur n'est pas actif, ce domaine va empêcher l'accès à la zone catalytique (Hubbard, 2004; Lemmon & Schlessinger, 2010).
- Le domaine intracellulaire via lequel le récepteur va exercer son activité kinase. Ce domaine est divisé en 2 : la partie proche de la membrane plasmidique présente un motif riche en glycine (GAGAFG) qui permet la fixation de la molécule ATP et d'une hélice α contrôle dont la fixation du ligand SCF permet son activation (Mol et al., 2003). La seconde partie possède une asparagine en position 810 qui organise les différents groupements phosphate de l'ATP. De plus, elle porte l'activité phosphotransférase de c-kit (Roskoski, 2005).

c. Rôle de la signalisation SCF/c-kit dans l'érythropoïèse

Les cellules hématopoïétiques immatures expriment à leur surface le récepteur c-kit. Les progéniteurs érythroïdes BFU-e et CFU-e montrent une forte expression de c-kit qui au cours de la différenciation cellulaire diminue (Ogawa, 1991; Uoshima et al., 1995). A partir du stade érythroblaste polychromatophile, l'expression de c-kit se fait uniquement en situation de stress (Gabbianelli et al., 1996). Dans un milieu de culture, le maintien de SCF ralentit la différenciation des progéniteurs érythroïdes (Muta et al., 1995 ; McIver et al., 2016). A l'inverse, des études *in vitro* ont montré qu'une régulation à la baisse de c-kit avait des effets drastiques sur le taux de maturation des érythroblastes (D'allard et al., 2013). La signalisation de c-kit permet également de diminuer l'apoptose des cellules érythroïdes (L. Lu et al., 1999).

Essentielle à son activité et à sa fixation à son récepteur, le SCF va s'homodimériser puis induire l'homodimérisation du récepteur c-kit par fixation via leurs domaines Ig-like (Ullrich & Schlessinger, 1990; Z. Zhang et al., 2000). La liaison entre le SCF et les deux c-kit va mener à un rapprochement des deux récepteurs puis à la formation du complexe c-kit/c-kit médié également par les Ig-like (Yuzawa et al., 2007). Les changements conformationnels de chaque domaine du complexe c-kit/c-kit va donner une conformation active du récepteur (Finger, Escher, & Schneider, 2009). À la suite de l'activation de son activité enzymatique, le récepteur va s'autophosphoryler sur huit résidus tyrosines dont la phosphorylation conduit au recrutement des protéines à domaine SH2 telles que la PLCγ, la phosphatase SHP2, des kinases Scr, et la protéine GRB2 ainsi que diverses autres enzymes telles que la PI3K par sa sous-unité p85 ou des enzymes Ras-GTPases. Ainsi, les voies de signalisation en aval, telles que les voies Ras/ERK, PI3K/Akt et JAK/STAT peuvent être activées (Rönnstrand, 2004). Ces voies sont impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire.

La signalisation en aval du récepteur c-kit est finement régulée par différents acteurs. À la suite de son activation différentes tyrosines phosphatase telle que SHP-1 vont être recrutées. Elles vont induire une déphosphorylation des tyrosines phosphorylées du récepteur (Kozlowski et al., 1998) éteignant la signalisation en aval de c-kit. La sérine/thréonine kinase PKC peut également restreindre la signalisation de c-kit en inhibant son activité kinase via ses liaisons sur des sérines du récepteur (P. Blume-Jensenet al., 1995; Peter Blume-Jensen et al., 1994). De plus, c-kit peut être internalisé et dégradé soit par le protéasome via l'ubiquitine E3 ligase Cbl (Masson et al., 2006; Miyazawa et al., 1994 ; Wisniewski, Strife, & Clarkson, 1996) soit par un processus d'endocytose menant à une dégradation par le lysosome (Robinson, 1994; Sorkin et al., 1995). Enfin, en absence de son ligand, c-kit peut être internalisé puis dégradé uniquement par le lysosome de manière indépendante de l'ubiquitine E-ligase (D'allard et al., 2013).

d. EPOR/c-kit dans l'érythropoïèse

Le SCF et l'EPO sont deux cytokines essentielles au bon déroulement du processus de différenciation des cellules érythroïdes. De la cellule souche hématopoïétique à la maturation des érythrocytes, les deux cytokines peuvent être impliquées dans la prolifération, la protection des cellules progénitrices et dans la différenciation terminale. Le SCF et l'EPO agissent l'une à la suite de l'autre. Ainsi la prolifération et la survie des érythroblastes est dépendante du SCF lors de la phase précoce de l'érythropoïèse alors que dans la phase tardive, la différenciation se

poursuit sous la dépendance de l'EPO. Des travaux ont montré que la réponse au SCF par les cellules n'était possible que par l'expression simultanée des récepteurs c-kit et EPOR (Wu et al., 1995). De plus, la cytokine peut induire la phosphorylation du récepteur à l'EPO (Jacobs-Helbert et al., 1997). De son côté, l'EPO induit la dimérisation du récepteur c-kit (Broudy et al., 1998).

B. Régulation de l'érythropoïèse par les autres facteurs de croissance

1. Les hormones

a. L'insuline, l'IGF-1 et IGF-2, hormone de croissance et leur récepteur

L'insuline est une hormone sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Chez une personne non diabétique, cette hormone peptidique est sécrétée de manière continue et possède un rôle fondamental dans de nombreux processus par la régulation de leur substrat énergétique tel que le glucose. L'insuline possède une homologie importante avec le facteur de croissance l'IGF-1 (Insulin-like growth factor) sécrété par le foie. Tous deux jouent un rôle dans l'érythropoïèse. Le récepteur tyrosine kinase de l'insuline (IR), un hétérodimère composé de deux sous-unités α extracellulaires liant l'insuline et de deux sous-unités β intracellulaires est exprimé sur les cellules hématopoïétiques. De nombreuses études expérimentales et animales ont permis d'affirmer que l'IGF-1 avait une influence positive sur l'érythropoïèse en contribuant au maintien d'une érythropoïèse normale (Abboud, Bethel, & Aron, 1991; Zumkeller et al., 1991) aussi bien au niveau des précurseurs que dans les globules rouges matures (Aron et al., 1991; Miyagawa et al., 2000). En effet, des études *in vitro* ont montré que l'IGF-1 agit de façon synergique avec le SCF pour induire la prolifération et la survie des érythroblastes et agit avec l'EPO au cours de la maturation terminale (Correa & Axelrad, 1991). En outre, plusieurs études indiquent que l'IGF-1 pourrait remplacer l'EPO dans son rôle de stimulateur principal de l'érythropoïèse (Aron et al., 1991; Merchav et al., 1992; Muta et al., 1994). Aux stades tardifs, l'IGF-1 stimule la synthèse d'hème. D'autres études expérimentales ont montré un effet de l'IGF-1 sur l'expansion des cellules souches $CD34^+$ (Hanley, Napolitano, & McCune, 2005). Des études réalisées chez des patients atteints d'un déficit primaire en IGF-1 comme dans le syndrome de Laron ont confirmé le rôle potentiel de l'IGF-1 dans l'érythropoïèse humaine (Hanley et al., 2005).

L'hormone de croissance (GH pour growth hormone) également appelée somatotrophine ou somatropine est sécrétée par les cellules somatotropes de la partie antérieure de l'hypophyse. Elle participe à la régulation de l'hématopoïèse en stimulant la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques (Hooghe et al., 1993). Au cours de l'érythropoïèse, la stimulation de la croissance des précurseurs érythroïdes par la GH est médiée par l'IGF-1 en présence de l'EPO (Golde DW & Bersch N, 1977; Hanley et al., 2005; Merchav et al., 1988). Une étude a montré que des rats hypophysectomisés souffrant d'anémie et possédant un faible taux d'EPO voient leur concentration sérique d'EPO augmentée suite à un traitement à la GH (Kurtz et al., 1988). A ce jour peu d'études ont été réalisées sur l'impact de la GH sur l'hématopoïèse. En 2018, une étude menée sur une cohorte pédiatrique a mis en évidence une amélioration significative de l'érythropoïèse durant un traitement sous hormone de croissance (Ciresi et al., 2018).

b. Les hormones stéroïdiennes

- Les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes (GC) exercent une importante stimulation sur l'érythropoïèse, notamment lors d'une érythropoïèse de stress (Bauer et al., 1999). En effet, l'organisme doit produite de façon efficace et rapide un grand nombre de globules rouges au cours d'un stress cellulaire tel que l'hypoxie ou l'hémolyse.

Une étude portée chez la souris a montré qu'une invalidation des récepteurs aux glucocorticoïdes induisait une inhibition d'une réponse érythroblastique suite à un stress (Bauer et al., 1999). Le SCF régule l'érythropoïèse de stress en induisant l'expression du récepteur aux GC (Varricchio et al., 2012). Ainsi, les glucocorticoïdes participent à la production importante de globules rouges en promouvant la prolifération des érythroblastes immatures tout en retardant l'induction de leur différenciation terminale (Von Lindern et al., 1999). Les GC tel que la dexaméthasone peuvent se lier à leur récepteur et permettre ainsi de moduler l'expression des gènes impliqués dans la prolifération érythroblastique comme c-*MYB*, c-*KIT* et *LMO2*. *In vitro*, l'emploi de la dexaméthasone - un GC de synthèse ayant des propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives - en synergie avec le SCF et l'EPO augmente le nombre de progéniteurs et précurseurs érythroblastiques. Elle augmente le nombre de mitoses de 2 à 4 des cellules $CD34^+$ et retarde la différenciation (Bauer et al., 1999). La dexaméthasone induit

également la dégradation de la protéine p53 par le protéasome (Fargo et al., 2013). L'expression de cette protéine augmente au cours de la différenciation érythroïde normale. p53 contribuerait donc à la régulation de la balance prolifération/différenciation des cellules érythroïdes (Ganguli et al., 2002). En inhibant l'expression de p53, la dexaméthasone favorise l'augmentation du nombre de progéniteurs (Flygare et al., 2011; Narla et al., 2011; Zhang et al., 2014).

D'autres récepteurs nucléaires tels que PPAR-α peuvent être activés dans les BFU-e en réponse aux GC (H.-Y. Lee et al., 2015). En absence de GC, leurs récepteurs sont isolés dans le cytoplasme. Une fois le GC fixé à son récepteur, celui-ci est transféré au noyau pour réguler la transcription du gène *c-KIT*. PPAR-α localisé dans le noyau est recruté à proximité des sites chromatidiens utilisés par le récepteur aux GC. Ceci mène à une prolifération des progéniteurs BFU-e. En outre, l'association de traitements aux GC et d'agonistes de PPAR-α tel que le GW7647 donne lieu à une amélioration de l'activité transcriptionnelle des récepteurs aux GC (H.-Y. Lee et al., 2015). Leur action synergique participe ainsi à accroître les progéniteurs et à terme, permet une production plus importante d'érythroblastes (figure 13).

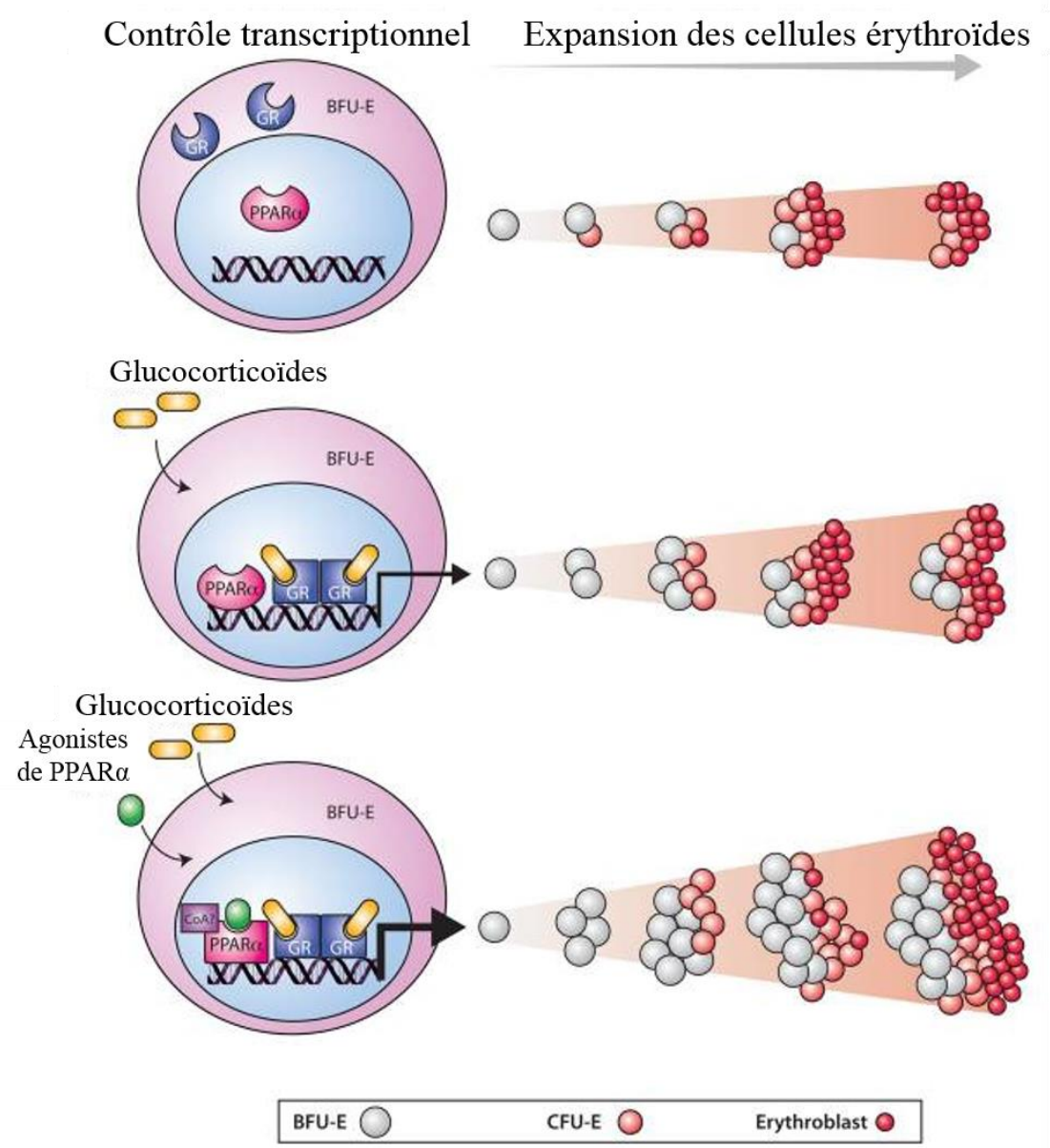


Figure 13 : Modèle de synergie entre PPAR-α et les GR. En condition normale, les cellules BFU-e se différencient en CFU-e puis en érythroblastes. En absence de GC, les GR sont séquestrés dans le cytoplasme. Lors d'un traitement par GC, les GR fixant leur ligand sont transloqués dans le noyau puis se lieront à la chromatine pour réguler la transcription des gènes érythroïdes induisant la prolifération des BFU-e. Lors de traitement par GC seul, le PPAR-α est recruté sur des sites de chromatine proches des GR sans rôle sur la prolifération érythroïde. Lors d'un co-traitement des GC et d'agonistes de PPAR-α, ce dernier activé interagit avec le GR pour moduler l'activité transcriptionnelle du GR. Cela conduit à une augmentation de la prolifération des BFU-e et génère davantage de CFU-e et érythroblastes (H.-Y. Lee et al., 2015).

- Les androgènes

L'effet des androgènes sur l'érythropoïèse a été décrit mais le mécanisme par lequel ils agissent n'est toujours pas établi (Naets & Wittek, 1966). Il a été observé que la concentration d'hémoglobine est plus élevée chez l'homme que chez la femme alors qu'à l'âge prépubère les deux sexes ont des concentrations en Hb similaires (Shahani et al., 2009). Cela coïncide avec la hausse du taux de testostérone chez l'homme (Yip, Johnson, & Dallman, 1984). Des concentrations basses d'hémoglobine chez la femme ne sont pas dues à une perte menstruelle chronique puisque cette différence entre les sexes persiste chez les femmes non menstruées (VAHLQUIST, 1950 ; Hendler et al., 1974 ;). Malgré cela, il existe des résultats contradictoires sur l'effet de la testostérone sur l'EPO. Alors que certaines études suggèrent que la testostérone favorise la production d'EPO (Barcelo et al., 1999 ; Shahani et al., 2009), d'autres n'ont trouvé aucune preuve appuyant cette observation (Coviello et al., 2008 ; Maggio etal., 2013). Il a été montré que les androgènes avaient un effet positif sur l'expansion des progéniteurs érythroïdes de la femme mais pas de l'homme. Dans des conditions optimales, la prolifération des progéniteurs a été multipliée par 10 en 60 jours (Leberbauer et al., 2005). Un des mécanismes possibles par lequel la testostérone pourrait stimuler l'érythropoïèse consiste en un effet direct sur les CSHs de la moelle osseuse via l'IGF-1 (Moriyama & Fisher, 1975).

Les androgènes exogènes augmentent l'érythropoïèse. Un traitement par androgène chez les femmes montre une augmentation de l'hémoglobine (Kennedy et al., 1955). Une équipe a montré que les précurseurs d'androgènes exerçaient leur effet androgénique par conversion en testostérone et n'activaient pas directement le récepteur des androgènes (Karunasena et al., 2016). Les androgènes jouent donc aussi un rôle au cours de l'érythropoïèse en favorisant la prolifération par rapport à la différenciation (Perrin et al., 1996 ; Leberbauer et al., 2005).

2. Les cytokines

a. Les principales interleukines

- IL-1

L'interleukine-1 peut inhiber l'érythropoïèse. En effet, l'IL-1 peut inhiber la prolifération et la différenciation des progéniteurs érythroïdes via l'interféron γ (Means,

Dessypris, & Krantz, 1992). Une exposition chronique des CSHs à l'IL-1 induit une augmentation du nombre de cellules myéloïdes, une anémie et une perte de synthèse de lymphocytes naïfs via le facteur PU.1 (Pietras et al., 2016).

- IL-3

L'interleukine-3 est produite par les lymphocytes T. Elle possède un large éventail d'activités dont la survie et la prolifération cellulaires ainsi que le développement des CSHs. Les progéniteurs immatures expriment à leur surface le récepteur à l'IL-3 (IL-3R). Les BFU-e sont dépendantes de cette interleukine qui va favoriser leur prolifération et leur différenciation. L'IL-3 va également permettre le maintien des cellules souches *in vitro* (Spivak, Smith, & Ihwe, 1985). Cependant, l'IL-3 n'influence pas le développement des progéniteurs et précurseurs érythroïdes plus matures (Umemura etal., 1989). L'IL-3 agit également en synergie avec l'EPO pour induire la prolifération des CSHs et la différenciation des progéniteurs érythroïdes (Migliaccio et al., 1988).

- IL-6

L'interleukine-6 est impliquée dans l'inhibition de la prolifération et de la différenciation des progéniteurs érythroïdes (Chasis & Mohandas, 2008; Morceau, Dicato, & Diederich, 2009). Elle intervient au niveau du foie où elle favorise la libération de l'hepcidine qui va empêcher l'absorption du fer au niveau de l'intestin et le relargage du fer des macrophages en inhibant la ferroportine (Nemeth et al., 2004). L'IL-6 diminue via la synthèse de l'hepcidine et la disponibilité du fer. Il semblerait que l'IL-6 altère la fonction mitochondriale dans les cellules érythroïdes au cours de la maturation entraînant une altération de la maturation érythroïde et de l'hémoglobine finale obtenue (McCranor et al., 2014).

- IL-10

L'interleukine-10 peut inhiber l'IL-3, l'IL-1 et le TNF. L'IL-1 et le TNF provoquent des perturbations de l'homéostasie du fer en induisant une hypoferrémie. Il semblerait que leur effet est lié à l'induction de la synthèse de l'IL-10. Ainsi l'anémie résulterait d'une stimulation de la translation de la ferritine par l'IL-10 dans les cellules du système réticulo-endothélial entraînant une diminution de la quantité de fer disponible. Cela provoque également une altération de la disponibilité de l'hème (Tilg et al., 2002). Des études montrent que l'IL-10 induit l'expression

de l'hème oxygénase-1 ce qui entraîne une dégradation excessive de l'hème. Tout cela peut contribuer au développement de l'anémie (T. S. Lee & Chau, 2002). L'IL-10 semble également avoir des effets inhibiteurs sur la prolifération des progéniteurs érythroïdes (Geissler et al., 1998).

a. Le TNF-α

La cytokine pro-inflammatoire TNF-α (Tumor Necrosis Factor α) principalement produite par les macrophages et les lymphocytes T, est impliquée dans l'apoptose des érythroblastes (Xiao et al., 2002). Johnson et ses collaborateurs ont été les premiers à montrer l'effet inhibiteur de la cytokine sur la formation des progéniteurs CFU-e en réalisant un test clonogénique chez la souris (C. S. Johnson, Chang, & Furmanski, 1988; R. A. Johnson et al., 1989). Par la suite, il a été montré que le TNF-α pouvait diminuer la production de la GPA dans les cellules CD34+ induite par l'EPO (Blick et al., 1987). Le TNF-α induit également une diminution d'expression de plusieurs gènes érythroïdes telle que la globine ΄Υ, la GPA et l'EPOR. Le TNF-α inhibe l'activité transcriptionnelle de GATA-1 en diminuant l'interaction entre GATA-1 et son co-facteur FOG-1 en dégradant ce dernier parallèlement à l'induction de l'expression de GATA-2 (Buck et al., 2008) (paragraphe ci-dessous). A cela s'ajoute l'activation de la voie NF-κB par le TNF-α capable d'inhiber l'expression de gènes érythroïdes. D'une part, il semble que NF-κB puisse favoriser la prolifération et la survie cellulaire et d'autre part il régule négativement la maturation des érythroblastes (J. J. Liu, Hou, & Shen, 2003). L'administration d'anti-TNF-α améliore l'anémie de l'inflammation (Bergamaschi et al., 2010; Corrado et al., 2017) alors que l'administration de TNF-α recombinant diminue la production d'hémoglobine de manière significative (Blick et al., 1987).

b. Interféron -΄Υ

L'interféron -΄Υ (IFN-΄Υ) est sécrété par les lymphocytes T et les lymphocytes Natural Killer (NK). Il joue un rôle dans la réduction d'expression de la ferroportine (Byrd & Horwitz, 1993). Il peut également inhiber la production de l'EPO au niveau du rein régulant ainsi négativement l'érythropoïèse (Jelkmann, 1998; Vannucchi et al., 1994). Enfin, il induit l'apoptose des érythroblastes de manière indirecte par une augmentation de l'expression des

récepteurs de mort au cours de la différenciation contribuant indirectement à la mort cellulaire programmée (Felli, Pedini, et al., 2005).

c. TGF-β (Transforming growth factor β)

La superfamille du TGF-β est constituée de plus de 30 facteurs de croissance solubles régulant la prolifération et la différenciation des CSHs via une boucle rétroactive négative (Zermati et al., 2000 ; Blank & Karlsson, 2015 ; Muench et al., 2018). Le TGF-β est un facteur essentiel de la niche hématopoïétique. Il est produit localement par diverses cellules comme les mégacaryocytes et les cellules de Schwann non myélinisantes (Yamazaki et al., 2011; Zhao et al., 2014). La signalisation du TGF-β est médiée par les protéines SMAD pouvant soit favoriser la différenciation érythroïde via SMAD2/3, soit inhiber la prolifération via SMAD6/7 (Larsson & Karlsson, 2005 ; U. Blank & Karlsson, 2011). Néanmoins, l'effet de la signalisation médiée par SMAD dépend du contexte micro-environnemental et est affecté par une régulation croisée avec d'autres voies de régulation au niveau de la niche (U. Blank & Karlsson, 2011; Blank & Karlsson, 2015; He et al., 2006). En plus d'une signalisation canonique du récepteur TGF-β via les SMAD, le TGF-β peut mener à l'activation de plusieurs autres voies telles que NF-κB via la voie TAK1/MEK/AKT, la voie RAS/MAPK/ERK et la voie PI3K/mTOR.

Ainsi, le TGF-β est un puissant régulateur de l'érythropoïèse en possédant une action paradoxale. D'un côté, il peut inhiber la prolifération des progéniteurs en les bloquant en phase G_1 du cycle cellulaire (Geng & Weinberg, 1993) et d'un autre côté, il peut accélérer leur différenciation terminale (Y. Zermati et al., 2000).

C. Régulation de l'érythropoïèse par les facteurs de transcription

Au cours de l'érythropoïèse, de nombreuses cascades de voies de signalisation sont activées et impliquent des facteurs de transcription possédant diverses fonctions. Peu de ces facteurs de transcription sont spécifiques d'une lignée hématopoïétique donnée mais sont redondants. Ils jouent parfois un rôle dans deux ou trois lignées différentes. L'existence de gènes exprimant des séquences *cis* au niveau de leur promoteur permettant leur association à des facteurs en *trans* agit sur l'engagement dans une lignée plutôt qu'une autre (Cantor & Orkin,

2002). Ainsi, les séquences *cis* 5'A/T GATA A/G 3' (GATA) (pour les gènes des globines ou GATA-1) et 5'TGAC/GTCAGA 3' (pour certains gènes érythroïdes) sont importantes pour une homéostasie dans la régulation de la différenciation érythroïde. La séquence GATA est associée à un GT ou CACC-like séquence au niveau des gènes impliqués dans l'érythropoïèse (S. Orkin, 1992). Ces motifs sont essentiels pour la transcription de ces gènes (Raich & Romeo, 1993).

1. Les facteurs trans-régulateurs de l'érythropoïèse

L'engagement des CSHs vers la lignée érythroïde et son processus de différenciation se réalise via de nombreuses protéines intervenant comme des éléments *trans*-régulateurs. Jouant un rôle d'activation ou de répression de la transcription, leur fonction est dépendante du complexe protéique avec lequel il va interagir. Parmi ces facteurs *trans*-régulateurs, nous retrouvons les facteurs GATA-1 et GATA-2 (GATA binding protein 1 et 2).

a. GATA-1 et GATA-2

Les GATA font partie de la famille des facteurs de transcription en doigt de zinc (Cys-X2-Cys-X17-Cys-X2-Cys) (Bresnick et al., 2010). Ce motif en doigt de zinc permet la liaison à l'ADN en son C-terminal et une stabilisation dans cette interaction en son N-terminal (Evans et al., 1988; Martin et al., 1989). Cette famille comprend six protéines dont trois agissent au cours de l'hématopoïèse : GATA-1, GATA-2 et GATA-3 mais seuls les deux premiers jouent un rôle dans l'érythropoïèse (figure 14). Les schémas d'expression de GATA-1 et GATA-2 se chevauchent partiellement notamment au niveau des érythroblastes (Fujiwara et al., 2004; Tsai & Orkin, 1997). Alors que GATA-2 intervient au cours de l'érythropoïèse précoce en participant à la prolifération cellulaire des progéniteurs, GATA-1 régule la maturation et la différenciation des précurseurs (figure 14). Ainsi les facteurs GATA-1 et GATA-2 collaborent étroitement tout au long de l'érythropoïèse pour réguler la transcription des divers gènes impliqués dans ce processus hématopoïétique. Leur système de régulation est parfaitement établi : GATA-2 réprime l'expression du gène *GATA-1* au début de l'érythropoïèse puis la diminution de l'expression de GATA-2 induira l'expression de GATA-1 (Ferreira et al., 2005).

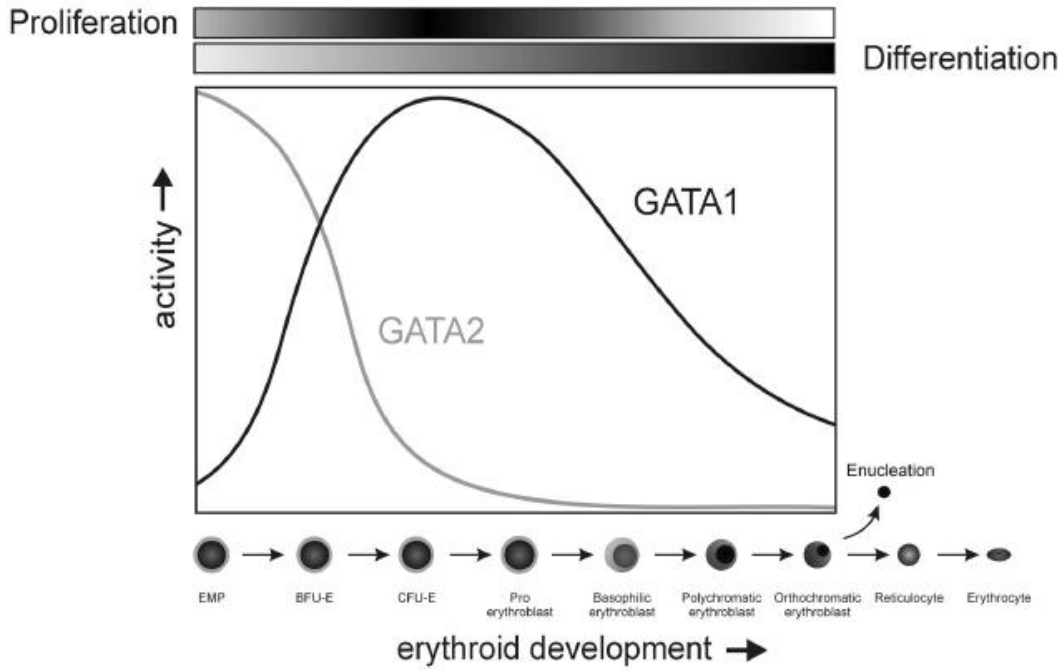


Figure 14 : Représentation du profil d'expression des facteurs de transcriptions GATA-1 et GATA-2 au cours de la différenciation érythroïde (Ferreira et al., 2005).

- **GATA-1**

Chez l'Homme, le gène *GATA-1* est localisé sur le chromosome X dont son expression au cours de l'hématopoïèse est restreinte aux lignées érythroïde, mégacaryocytaire, mastocytaire et éosinophile (Shimizu & Yamamoto, 2005). Il est faiblement exprimé dans les progéniteurs érythroïdes puis son expression augmente fortement au cours de la différenciation érythroïde. L'activité transcriptionnelle de GATA-1 dépend de la protéine avec laquelle il va interagir. Certaines interactions induiront une activation de GATA-1 alors que d'autres l'inhiberont.

Le domaine C-terminal assure la liaison à l'ADN, alors que la région du doigt de zinc en N-terminal de GATA-1 interagit avec un facteur clé FOG-1 (Friend of GATA-1) (Fujiwara et al., 2017) facilitant ainsi la liaison de GATA-1 à un sous-ensemble de sites de liaison contenant un motif palindromique (Hasegawa et al., 2016; C. D. Trainor et al., 1996) comme le complexe MeCP1 constitué de MBD2 (methyl-DNA binding protein, p66/68 et du complexe Mi-2/NuRD). Lors de son partenariat avec FOG-1 (GATA-1/GATA-1), GATA-1 fait partie des complexes activateurs de la transcription des gènes de l'hématopoïèse alors qu'il est répresseur

lorsqu'il se lie à MeCP1 (GATA-1/FOG-1/MeCP1) notamment du gène *GATA-2* (Shimizu and Yamamoto, 2005).

Le facteur de transcription GATA-1 peut également former un complexe avec un autre régulateur principal de l'hématopoïèse, SCL/TAL-1 (Stem cell leukemia/T-cell acute lymphoblastic leukemia-1) (Wadman et al., 1997). L'interaction entre le complexe SCL/TAL-1 et GATA-1 conduit à une régulation positive de l'érythropoïèse ainsi que des CSHs (Lahlil et al., 2004). De plus, des études *in vitro* ont révélé que le complexe GATA-1/SCL/TAL1 s'associe à un autre complexe contenant E2A, LMO2 (LIM domain only 2) et LDB1 (LIM domain binding 1) tous nécessaires à l'érythropoïèse (Shivdasani et al., 1995 ; Göttgens et al., 2002; Inoue et al., 2013)(figure 15).

Le corépresseur hématopoïétique ETO2 peut s'associer au complexe GATA-1/SCL/TAL-1 lui conférant ainsi une répression transcriptionnelle induite par une interaction avec les HDAC (histones désacétylases) (Amann et al., 2001 ; Tripic et al., 2009 ; Fujiwara et al., 2010; Soler et al., 2010 ; Fujiwara et al., 2013). GATA-1 peut également recruter le complexe PRC2 (polycombique 2). Il s'agit d'un complexe composé de EZH2 (une histone méthyltransférase), SUZ12 et EED (2 composants structurels). Cette interaction conduit à une répression transitoire médiée par la triméthylation de l'histone H3 (J. Müller et al., 2002).

Enfin, la liaison de GATA-1 avec le facteur de transcription PU-1 (Purin-riche binding box 1) inhibe l'interaction entre l'extrémité C-terminale du doigt de zinc de GATA-1 et l'ADN. Il est suggéré que la concentration relative de GATA-1 et PU-1 pourrait représenter le commutateur qui engage les cellules progénitrices vers la lignée érythro-mégacaryocytaire (forte concentration GATA1) ou granulo-monocytaire (forte concentration PU-1) (T. Ling et al., 2018).

L'activité transcriptionnelle de GATA-1 est régulée par des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation, la phosphorylation ou la sumoylation. Lorsque la protéine p300/CBP (CREB-binding protein) acétyle GATA-1, ce dernier s'homodimérise puis s'active. Mais GATA-1 peut également être phosphorylé par la protéine Akt qui dans ce cas va induire une augmentation de son activité et induire l'expression de gènes érythroïdes comme TIMP-1 (Tissue Inhibitor of matrix Metallo Proteinase). En outre, l'activation de GATA-1 peut également activer positivement des promoteurs de gènes érythroïdes comme celui de la GPA constitutive de la membrane du globule rouge, des chaînes de globine ou de l'EPO, certaines enzymes du métabolisme de l'hème telle que la PBGD (porphobilinogène désaminase)

(Frampton et al., 1990; Shimizu & Yamamoto, 2016; Zon et al., 1991). En formant un complexe avec Gfi-1b (Growth Factor Independent 1B transcription repressor) GATA-1 est capable de réprimer l'expression de gènes responsables de la régulation du cycle cellulaire tel que c-*MYC* (Laurent et al., 2009) ou d'en activer certains autres tels que p18, p27 et p21 (Papetti et al., 2010). GATA-1 active également la transcription de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL ce qui assure une survie cellulaire des érythroblastes (T. Gregory et al., 1999).

- **GATA-2**

GATA-2 est fortement exprimée dans les CSHs, les progéniteurs multipotents, les précurseurs érythroïdes, les mégacaryocytes, les éosinophiles et les mastocytes (Bresnick et al., 2010; Y. Fujiwara et al., 2004b; Minegishi et al., 1999; Tsai & Orkin, 1997; Zon et al., 1993). L'expression de GATA-2 est primordiale pour le maintien des CSHs et pour la différenciation terminale érythroïde (Tsai & Orkin, 1997). En effet, le facteur de transcription GATA-2 est impliqué dans l'auto-renouvellement et la prolifération des CSHs (K. W. Ling et al., 2004). Des études chez la souris ont révélé qu'un dysfonctionnement homozygote de GATA-2 (souris gata-$2^{-/-}$) était létal pour l'embryon en raison de l'échec de l'hématopoïèse (Tsai et al., 1994). Les souris hétérozygotes invalidées pour GATA-2 (souris gata-$2^{+/-}$) sont viables mais présentent une perturbation de la longévité de leurs CSHs (Rodrigues et al., 2005). En revanche, une surexpression de GATA-2 dans la moelle osseuse inhibe l'hématopoïèse (Persons et al., 1999). GATA-2 peut réguler sa propre transcription ainsi que celle du gène *GATA-1* qu'il régule négativement au début de la différenciation érythroïde (Bresnick et al., 2010).

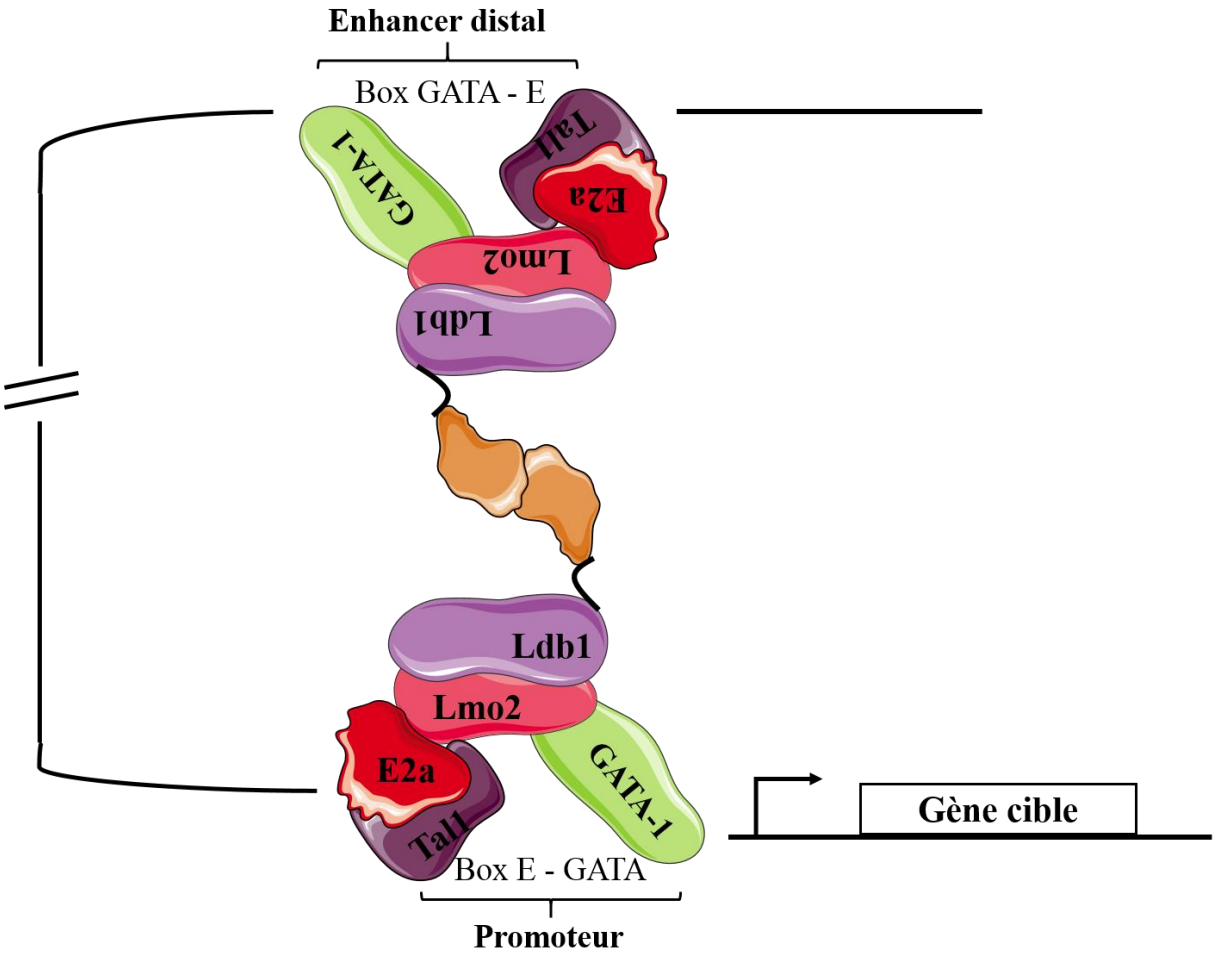


Figure 15 : Schématisation du complexe Transcriptionnel activateur de GATA-1. Il est composé des facteurs de transcription GATA-1, TAL1, Ldb1 ET Lmo2. Les boucles de ce complexe se fixent aux promoteurs pour activer les gènes cibles.

Des désordres hématologiques peuvent émerger en cas de déséquilibre de cette balance GATA-1/GATA-2. Ces deux facteurs peuvent subir des modifications post-traductionnelles comme l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitinylation et la sumoylation. Ces modifications peuvent moduler l'interaction de GATA-1 avec d'autres facteurs.

b. Les autres facteurs trans-régulateurs de l'érythropoïèse

- FOG-1

Le co-facteur le plus important de GATA est FOG-1. Il s'agit d'une protéine possédant 9 domaines en doigts de zinc exprimée notamment dans les cellules érythroïdes (Tsang et al., 1997). FOG-1 interagit avec 4 des 9 domaines en doigt de zinc de la partie N-terminale de GATA-1. Cette interaction est essentielle pour un déroulement normal du processus de différenciation (Fox et al., 1999; Tsang et al., 1997). En effet, une délétion de FOG-1 entraîne un blocage de l'érythropoïèse (Tsang et al., 1998). Ce co-facteur rend possible la liaison entre GATA-1 et des sites cibles comme le promoteur de la globine β (Letting et al., 2004). De plus, il va participer à la substitution du facteur GATA-2 par GATA-1 en facilitant leur liaison (Pal et al., 2004). FOG-1 recrute d'autres protéines afin de moduler l'activité de GATA-1 (Tsang et al., 1998).

- PU.1

Le facteur de transcription PU.1 (ou SPI-1) appartient à la famille des facteurs de transcription ETS. Il est essentiel au développement des progéniteurs lymphoïdes B et T, des monocytes et des granulocytes. Il a été démontré qu'une délétion de PU.1 chez la souris conduit à une absence de cellules hématopoïétiques (Scott et al., 1994). PU.1 est un répresseur de GATA-1 en empêchant son acétylation et donc son activation via une inhibition de la protéine p300/CBP. De plus, PU.1 a la capacité de former un complexe transcriptionnel répressif occupant les promoteurs des gènes cibles de GATA-1 en recrutant des protéines telles que des histones méthyl-transférases (Suv39H), des protéines de l'hétérochromatine, et la protéine pRb (Retinoblastoma protein). Le domaine ETS de PU.1 permet une liaison au domaine de liaison à l'ADN de GATA-1 et d'inhiber son activité transcriptionnelle. GATA-1 et PU.1 s'inhibent réciproquement (Rekhtman et al., 1999). Cependant, le facteur de transcription PU.1 est exprimée faiblement au cours de l'érythropoïèse et n'est pas détectable dans les stables tardifs (Stopka et al., 2005).

- EKLF/KLF1

Le facteur de transcription EKLF (Erythroïd Kruppel-Like Factor ou KLF1 (Krüppel-like factor 1)) est un facteur à doigt de zinc interagissant avec une haute affinité avec le motif *cis* CACCC (I. J. Miller & Bieker, 1993). Des mutations du gène *EKLF* ou de la séquence *cis* conduisent à une β-thalassémie (Orkin et al., 1982). Une mutation de KLF1 (c.973G>A ; p.E325K) est responsable d'une anémie dysérythropoïètique congénitale particulière (CDAIV) (Arnaud, Am J human genetic, 2010). KLF1 interagit également avec GATA-1 et augmente son activité transcriptionnelle (Gregory et al., 1996; Merika & Orkin, 1995). KLF1 a un rôle majeur dans le passage de l'hémoglobine fœtale et l'hémoglobine adulte (Siatecka & Bieker, 2011). La transcription de KLF1 est possible via le complexe GATA-1/Tal1/Ldb1/Lmo2/E2a (Wadman et al., 1997).

- TAL-1 et Lmo2

La protéine TAL-1 (T cell Acute Leukemia ou SCL (Stem Cell Leukemia) est de la famille des facteurs de trancription à domaine bHLH (basic Helix-Loop-Helix). Elle est constituée de deux hélices α séparées par une boucle lui permettant sa dimérisation. La protéine appartient, avec le facteur de transcription GATA-1, à un complexe formé de Ldb1 (LIM domain binding protein 1), Lmo2 (LIM domain only 2), TAL-1 et E2A qui active la transcription des promoteurs (Wadman et al., 1997) et régule des protéines impliquées dans l'érythropoïèse. En effet, le complexe GATA-1/Tal1/Ldb1/Lmo2/E2a concoure avec KLF1à l'induction de la transcription des gènes érythroïdes (Love, Warzecha, & Li, 2014).

- Lyl-1

Lyl-1 est un facteur de transcription régulant la différenciation érythroïde. Il est constitué d'un motif basique étroitement lié à SCL/TAL-1. Les souris *Lyl-1*$^{-/-}$ présentent une érythropoïèse diminuée avec un arrêt partiel de la différenciation ainsi qu'une apoptose accrue associée à une diminution de l'expression de Bcl-xL dans la moelle osseuse. De plus, les cellules *Lyl-1*$^{-/-}$ issues de la moelle osseuse subissent une altération importante dans leur

capacité à reconstituer la lignée érythroïde. Parallèlement, les cellules progénitrices et les précurseurs érythroïdes sont significativement augmentés dans la rate. L'expression de Lyl-1 est diminuée lors de la différenciation érythroïde dans la rate alors qu'elle est augmentée dans la moelle osseuse. La perte d'expression du facteur de transcription entraîne une augmentation des transcrits GATA-1 et SCL/TAL-1 au niveau de la rate (Capron et al., 2011).

D. Régulation de l'érythropoïèse par les microARN

Les miARN (ou microARN) appartiennent à une famille de petits ARNnc (ARN non codant) de 20 à 22 nucléotides. Ils régulent l'expression des gènes en ciblant les ARNm de manière spécifique induisant une répression traductionnelle ou une dégradation de l'ARNm (He et al., 2004 ; Huntzinger & Izaurralde, 2011). En outre, les miARN jouent un rôle important dans plusieurs processus biologiques comme le cycle cellulaire, la différenciation ou l'apoptose (Bueno & Malumbres, 2011; Salminen et al., 2011).

Les miARN sont initialement transcrits en tant que transcrits primaires (ou pri-miARN) qui vont former des pré-miARN puis des miARN matures. Les pré-miARN sont pris en charge dans le noyau via un processus appelé complexe de microprocesseur. Ce complexe protéique comprend la ribonucléase Drosha et la protéine DGCR8 (DiGeorge syndrome chromosomal region 8) (Krol et al., 2010). DGCR8 est une protéine de liaison à l'ARN double brin qui semble guider Drosha et cliver le pri-miARN pour former le pré-miARN. Par la suite, ce dernier est exporté du noyau vers le cytoplasme par le système exportine 5/Ran-GTP (Zeng & Cullen, 2004). Les pré-miARN interagissent avec le complexe Dicer - une RNase de type III - via son composant central TRBP (TAR RNA Binding Protein) qui initie également la formation du complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex) composé des protéines Dicer, Ago2 et TRBP. L'ARN double brin incorporé au complexe va induire la production des miARN matures simples brins (Fareh et al., 2016) (figure 16).

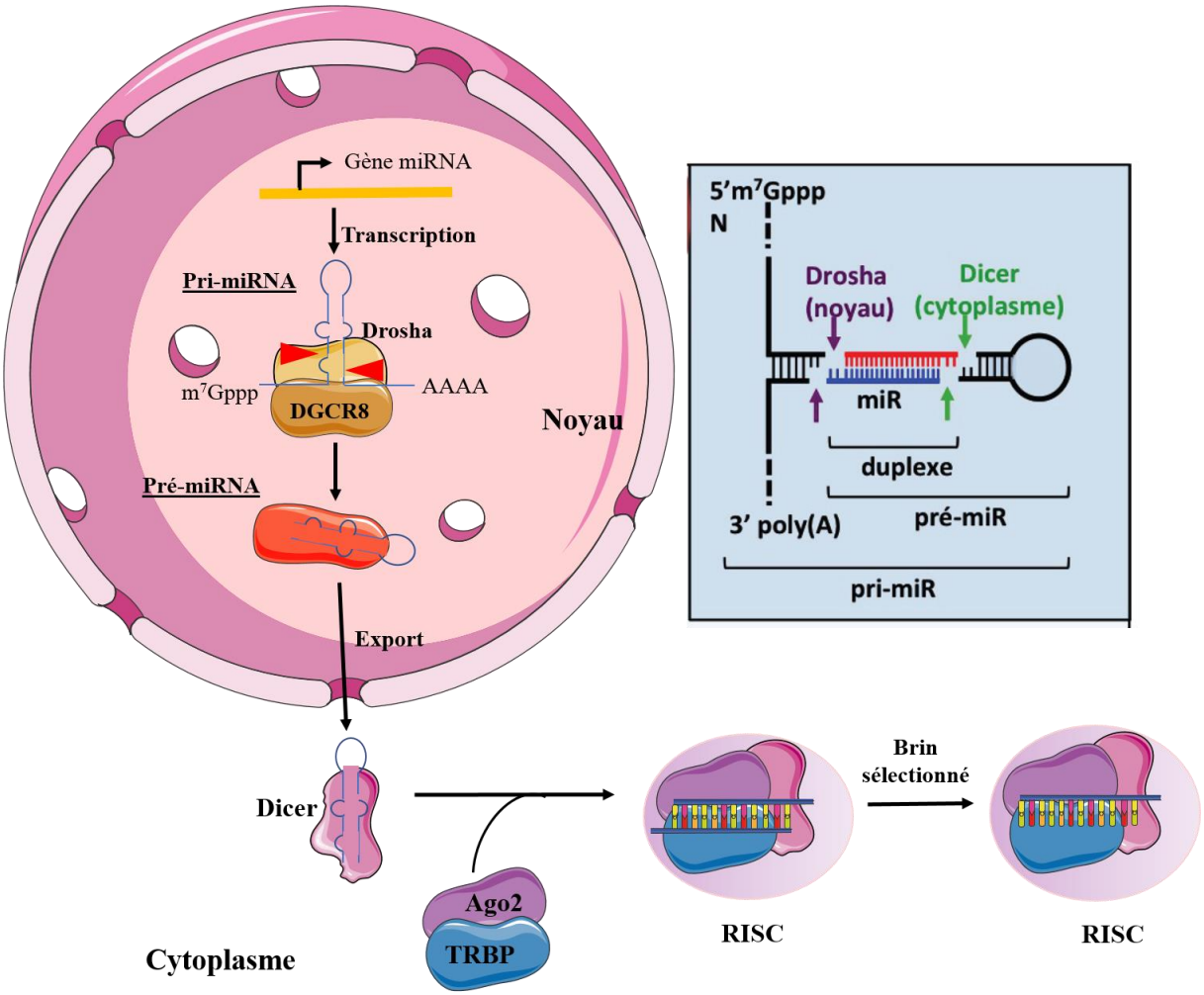


Figure 16 : Schématisation de la biogenèse des miRNA. Suite à leur transcription, le pri-ARN localisé dans le noyau est clivé par la ribonucléase DROSHA. Ce clivage entraîne la formation d'une boucle et donne le pré-miARN. Ce dernier est exporté vers le cytoplasme via un système d'exportine. Le pré-miARN est ensuite clivé par le complexe Dicer pour former un duplexe d'ARN qui va être intégré au sein du complexe RISC et former le mi-ARN mature (D'après Kim et al., 2009).

Plusieurs mi-ARN ont été identifiés comme possédant un rôle primordial dans l'érythropoïèse.

Les miARN – 221 et 222 sont fortement exprimés dans les cellules progénitrices $CD34^+$ dérivées de sang de cordons humains (Felli et al., 2005). D'autres mi-ARN ont été assimilés comme essentiels pour le développement, la différenciation et la maturation des cellules

érythroïdes. Particulièrement, les mi-ARNS 15b, 16, 22 et 185 qui sont fortement exprimés et corrélés positivement avec l'apparition d'antigènes érythroïdes de surface comme CD71, CD36 et GPA (Ling, He, & Mcniece, 2007). Les mi-ARN-144 et 451 appartiennent à un même cluster et jouent un rôle primordial dans la différenciation érythroïde. Ces deux mi-ARN sont portés par un même pri-miARN dont la transcription est régulée par le facteur de transcription GATA-1 (Dore et al., 2008). Des expériences chez différents modèles animaux ont montré qu'une extinction du mi-ARN-451 inhibe l'érythropoïèse et qu'une déficience du cluster induit un blocage de la maturation érythroïde terminale (Rasmussen et al., 2010). Fortement exprimés dans les précurseurs des cellules érythroïdes, ils permettent également de lutter contre le stress oxydant et de réprimer la respiration mitochondriale (Xu et al., 2019). Le mi-ARN-486 est également un micro-ARN dont la transcription est également régulée par GATA-1 (Shaham et al., 2015). Une expression du mi-ARN entraîne la différenciation des cellules $CD34^+$. De plus, au cours de l'érythropoïèse, son expression est augmentée parallèlement à l'augmentation de la globine γ (Lulli et al., 2013; Shi et al., 2016). Le niveau d'expression du mi-ARN 2010 est élevé suite à une stimulation par l'EPO et son inactivation conduit à une apoptose des cellules. Il semble jouer un rôle dans la maturation des érythroblastes et dans l'expression du gène de la globine γ (Kosaka et al., 2008). De plus, il est hautement exprimé dans les précurseurs érythroïdes (Bianchi et al., 2009). Enfin, le miARN-126, décrit comme un nouveau régulateur négatif physiologique de c-MYB semble promouvoir l'érythropoïèse *in vitro* (Grabher & Payne, 2010).

Le mi-ARN-155 est impliqué dans le contrôle de la différenciation érythroïde (Iii et al., 2007) et voit son expression diminuer au cours de l'érythropoïèse (Masaki et al., 2007). L'augmentation du niveau de mi-ARN-155 est associée à une réduction de la quantité de précurseurs érythroïdes et de CSHs circulantes (Mohammdai-Asl et al., 2015; D. Zhang et al., 2017). Le mi-ARN-222 est un micro-ARN inhibiteur de l'érythropoïèse pouvant bloquer la différenciation érythroïde des cellules $CD34^+$ (Vian et al., 2014). Son induction est due à des facteurs de transcription tels que PU.1 ou CEBPα (Fazi et al., 2005; Sugatani & Hruska, 2009). Le mi-ARN-223 inhibe l'érythropoïèse en agissant sur la protéine cible Lmo2, un des composants du complexe GATA-1/TAL1-Ldb1/E2A (Felli et al., 2009).

La figure 17 résume les différents miRNA intervenant dans l'hématopoïèse et en particulier l'érythropoïèse.

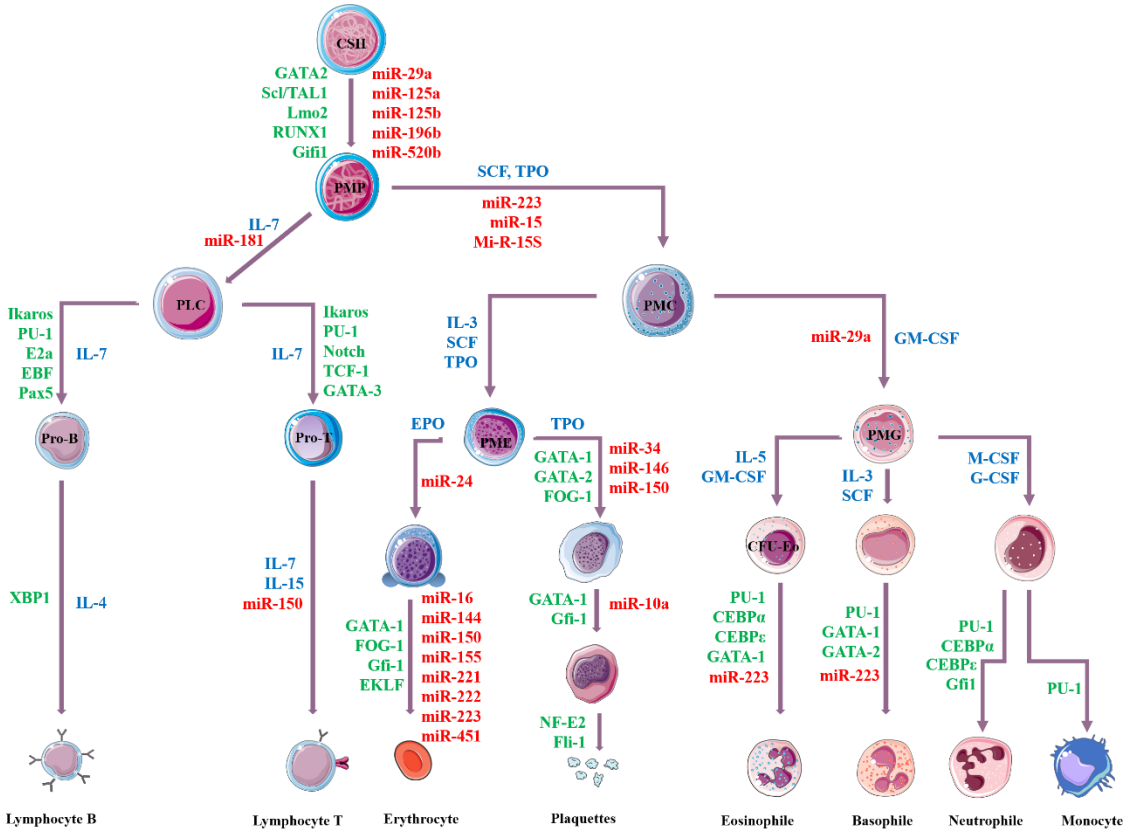


Figure 17 : Représentation des différents facteurs dont les miRNA ayant un rôle dans l'hématopoïèse

E. Régulation de l'érythropoïèse par l'apoptose

1. Les récepteurs de mort et leurs ligands

L'érythropoïèse peut également être régulée au sein des îlots érythroblastiques de la moelle osseuse. Les érythroblastes peuvent interagir entre eux soit pour stimuler la prolifération et la survie cellulaire soit pour arrêter la maturation et induire l'apoptose. L'activation de l'apoptose des cellules érythroïdes est dépendante du nombre de précurseurs érythroblastiques les plus matures (polychromatophiles et acidophiles) présent dans la moelle et de la concentration d'EPO circulante. Les érythroblastes les plus matures interagissent avec les érythroblastes les plus immatures (proérythroblastes et érythroblastes basophiles) via les récepteurs de mort Fas et TRAIL-R et leur ligand, respectivement Fas-L (Fas Ligand) et TRAIL (De Maria et al., 1999; Zamai et al., 2000).

Le récepteur Fas a une expression graduelle au cours de l'érythropoïèse mais il est exprimé durant toute l'érythropoïèse à la différence de son ligand, permettant ainsi la régulation Fas/Fas-L. Présent à la surface des cellules érythroblastiques les plus immatures, l'expression de Fas augmente progressivement entre les stades BFU-e et CFU-e pour atteindre une expression maximale entre les stades proérythroblastes et érythroblastes basophiles. Inversement, le ligand de Fas, Fas-L est uniquement exprimé à la surface des érythroblastes les plus matures (De Maria et al., 1999; Testa, 2004). L'expression du récepteur est donc antérieure à l'expression de son ligand. Ainsi le nombre d'érythroblastes matures présents dans la moelle osseuse contrôle de manière rétroactive l'érythropoïèse. Cependant, certains érythroblastes immatures peuvent être insensible à Fas-L. Cela est dû à la présence d'un inhibiteur des caspases 8 et 10, c-FLIP (Hietakangas et al., 2003), rendant les cellules érythroïdes les plus immatures insensibles à Fas-L (Kim et al., 2002). L'apoptose induite par Fas peut également être modulée par la concentration d'EPO circulante ou par certaines cytokines telles que l'interféron-γ ou le SDF(Gibellini et al., 2000 ; Felli et al., 2005). En effet, le Fas-L interagit avec son récepteur lorsque la concentration d'EPO circulante est faible telle une régulation par rétrocontrôle négatif. Dans ce cas, il n'y a pas nécessité de produire beaucoup de cellules érythroïdes et l'apoptose des précurseurs les plus immatures par les précurseurs les plus matures via Fas-L peut être réalisée. Néanmoins, au cours de l'érythropoïèse de stress induite pour répondre à un besoin, de fortes doses d'EPO et le SCF peuvent dépasser les effets de Fas-L (De Maria et al., 1999).

L'interaction entre Fas et Fas-L induit un arrêt de la différenciation érythroïde via le recrutement de FADD, une molécule adaptatrice, suivi de l'activation de caspases (figure 18). Ces évènements donnent lieu au clivage des facteurs de transcription TAL-1 et GATA-1. Ces mécanismes peuvent expliquer la mort prématurée des cellules érythroïdes dans la finalité de conserver un pool de progéniteurs et précurseurs érythroïdes en nombre normal.

Le TRAIL-R joue un rôle dans la régulation de l'érythropoïèse comparable au système Fas/Fas-L. Les interactions entre le récepteur et son ligand TRAIL régulent négativement l'érythropoïèse (Zamai et al., 2000). L'apoptose induite par cette voie est liée à une diminution de l'expression de c-FLIP. Cependant, bien qu'à faible dose d'EPO, TRAIL-R soit activé et induise l'apoptose, à forte dose d'EPO, les cellules résistent à la mort cellulaire mais ne se différencient plus.

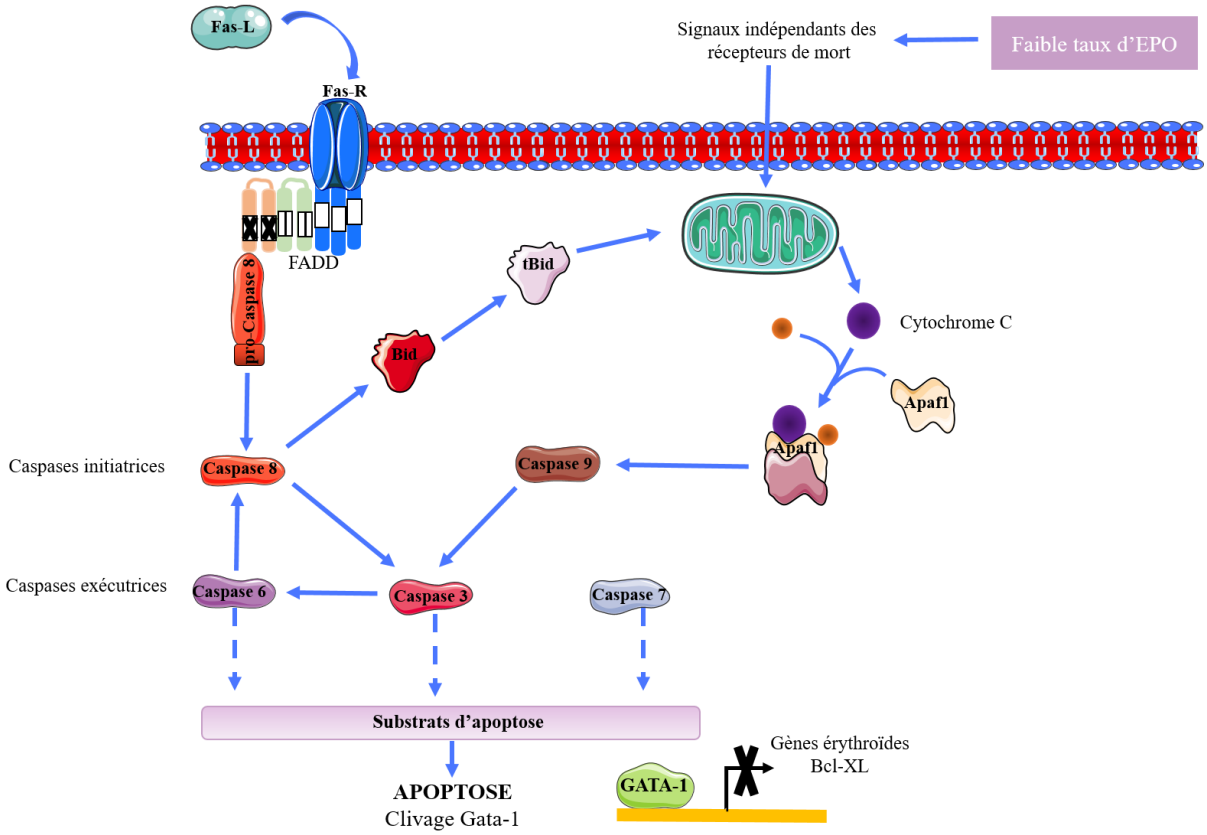


Figure 18 : Régulation de l'apoptose au cours de l'érythropoïèse. Une diminution de la concentration en EPO ou une interaction des récepteurs de mort et de leur ligand tel que Fas et Fas-L induit l'apoptose. Ces divers stimuli conduisent à une apoptose via une activation de la voie de cascade d'activation des caspases de manière indépendante ou non de la voie mitochondriale (Courtois et al., 2007).

2. Rôles des caspases

Les caspases peuvent induire l'apoptose des érythroblastes suite à la stimulation des récepteurs de mort Fas et TRAIL-R ou à la privation de l'EPO. De nombreuses études ont montrer l'importance des caspases au cours de l'érythropoïèse (Paddy et al., 1990 ; B. Y. Zermati et al., 2001 ; Carlile et al., 2004). Ces deux voies sont capables d'activer les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose.

La liaison Fas/Fas-L menant au recrutement de la molécule FADD (Fas-associated protein with death domain) va induire l'activation d'une cascade commençant soit par la

caspase 8 soit par la caspase 10 au sein du complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex). L'activation de la caspase 8 active en retour la caspase 3 ou des protéines pro-apoptotiques. En effet, les protéines pro-apoptotiques appartenant à la famille Bcl-2 telles que Bax et bid sont exprimées de manière constitutive dans les progéniteurs érythroïdes (Gregoli & Bondurant, 1997). Ces deux protéines peuvent provoquer la formation de pores au niveau de la membrane mitochondriale induisant ainsi les voies intrinsèques de l'apoptose. Cette dépolarisation de la membrane entraîne une libération du cytochrome c qui, avec la protéine Apaf-1 et la pro-caspase 9, va former l'apoptosome. La formation de ce complexe mène à l'activation de la caspase 9 puis de la caspase 3. Dans les deux situations, une fois la caspase 3 activée, elle clivera les protéines GATA-1 et TAL-1 (De Maria et al., 1999) (figure 18). GATA-1 contrôlant la transcription de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL, son clivage empêche l'induction de cette protéine. Bcl-xL non induite ne pourra pas empêcher la dépolarisation mitochondriale ni effectuer son rôle anti-apoptotique. Cependant, GATA-1 peut est protégé de l'action de la caspase 3 par son chaperon HSP70. La protéine HSP70 protège les cellules de l'apoptose en agissant en amont de l'activation des caspases par association à Bax ou AIF (Apoptosis Inducing Factor) et en aval de la mitochondrie via le cytochrome c ou la protéine Apaf-1. Durant l'activation des caspases, GATA-1 est colocalisé avec la caspase 3 au noyau. Au cours de la différenciation, la protéine HSP70 localisée dans le noyau protège GATA-1 du clivage. Suite à la privation d'EPO ou l'activation des récepteurs de mort, le chaperon HSP70 migre du noyau vers le cytoplasme permettant le clivage de GATA-1 par la caspase 3, entraînant l'inhibition de Bcl-xL et l'induction de l'apoptose (Ribeil et al., 2007). Ainsi, la protéine HSP70 possède un rôle anti-apoptotique et semble être un élément important de la régulation apoptotique lors de la maturation érythroïde terminale.

De part une diminution de la voie STAT5 médiée par l'EPO, la privation en EPO peut également mener à l'apoptose par voie mitochondriale. Cette voie peut également mener à la diminution transcriptionnelle de Bcl-xL suite au clivage de GATA-1.

Par ailleurs, l'activation de c-kit et de l'EPOR dans les progéniteurs érythroïdes peuvent induire la phosphorylation et l'activation de GSK3. En privation d'une des cytokines, Akt via la voie PI3K n'est plus activée et n'inhibera plus GSK3 qui s'accumulera, donnant lieu à un changement conformationnel de la protéine Bax. Cela augmentera son activité apoptotique (Somervaille et al., 2001). De même, en cas de privation d'EPO, FOXO3a n'est plus inhibé par Akt. Il ne sera plus exporté hors du noyau. Il pourra ainsi induire l'expression de protéines pro-apoptotiques Bim et Fas-L.

Les caspases possèdent un rôle clé dans la régulation négative de l'érythropoïèse au cours des stades dépendants de l'EPO. L'activation transitoire des caspases est nécessaire pour la différenciation des cellules et les étapes précoces de la maturation mais n'est pas requise pour le processus d'énucléation (Carlile et al., 2004; Kolbus et al., 2002; B. Y. Zermati et al., 2001). Le processus d'énucléation semble impliquer la protéine p53 (Peller et al., 2003) et la DNAse II au sein de l'îlot érythroblastique. Bien que les mécanismes exacts de l'activation des caspases au cours de la maturation des cellules érythroïdes ne soient pas parfaitement connus, les conséquences de leur activation sont mieux maîtrisées. La différenciation terminale et les mécanismes apoptotiques présentent des similitudes notamment dans la condensation de la chromatine et la dégradation des composés nucléaires. La lamine B, une protéine associée à la membrane nucléaire est ainsi clivée par l'activation successive de la caspase 3 puis la caspase 6 (Paddy et al., 1990). La protéine impliquée dans la condensation de la chromatine, Acinus, est aussi clivée par la caspase 3 (Sahara et al., 1999). Inversement, ICAD (protéine inhibitrice de la protéase CAD), un chaperon de CAD (Caspase Activated DNase), n'est pas clivée et bloque le clivage de l'ADN par CAD (Lui & Kong, 2006). L'identification des cibles potentielles des caspases est une étape primordiale pour une bonne compréhension de tous les mécanismes du processus de différenciation des érythrocytes.

En conclusion, l'érythropoïèse est un processus cellulaire parfaitement régulé. Le microenvironnement, les facteurs de croissances et les facteurs de transcription agissent positivement ou négativement sur la régulation de la production des érythrocytes (figure 19).

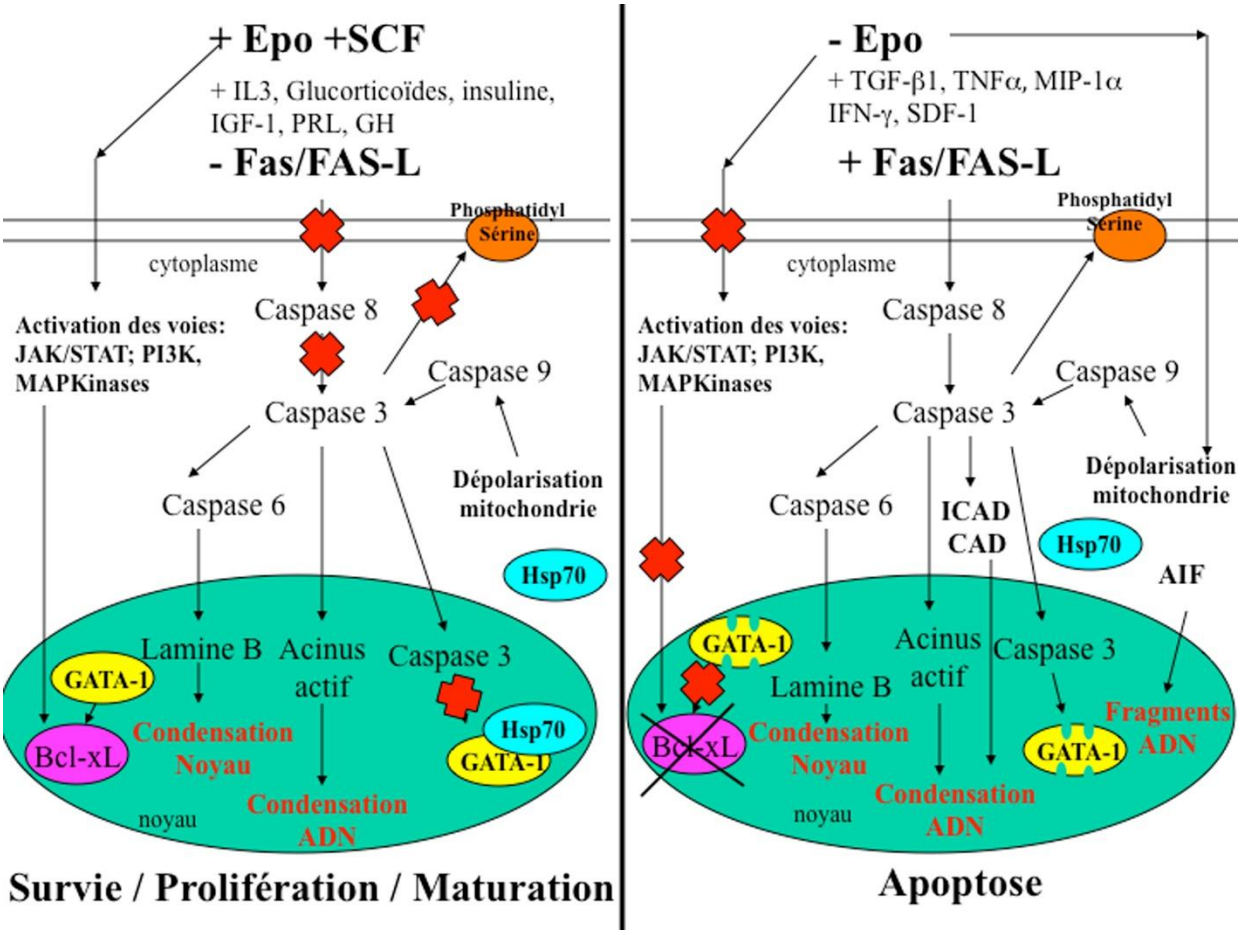


Figure 19 : Schématisation de la régulation positive et négative de l'érythropoïèse par les facteurs de croissance et les récepteurs de mort. (Thèse H. Moniz-Koum)

Chapitre 2 : L'anémie de Blackfan-Diamond (ABD) : une érythroblastopénie congénitale

I. Historique de l'ABD

L'anémie de Blackfan-Diamond (ABD) fut décrite pour la première fois par le Dr H.W. Joseph (Josephs, H. W. 1936), qui diagnostiqua deux patients atteints d'anémie hypoplasique congénitale en 1936. En 1938, deux médecins américains L.K Diamond et K.D Blackfan apportèrent un rapport plus détaillé de quatre cas d'anémie hypoplasique congénitale (Diamond, L. K. 1938). Par la suite, la maladie fut communément désignée par le terme d'anémie de Blackfan-Diamond. Dans la littérature, la maladie est décrite par une anémie congénitale chronique arégénérative rare.

La transfusion sanguine constituait l'unique traitement. Cependant, la surcharge en fer post-transfusionnelle, sa principale complication, aggravait le pronostic des patients avec l'apparition d'atteintes cardiaque et/ou hépatique. La découverte des corticoïdes en 1951 et de leur efficacité sur un patient, a permis de diminuer le nombre de transfusions sanguines. En parallèle, les chélateurs en fer tels que la déféroxamine (DFO) furent associés aux transfusions afin de diminuer ou prévenir l'apparition d'une surcharge en fer. Entre les années 1950-1990, la culture cellulaire de progéniteurs érythroïdes issue de sang périphérique ou de moelle osseuse de patients a permis d'identifier la présence d'un blocage de la différenciation de ces progéniteurs au passage du stade EPO-indépendant (BFU-e) au stade EPO-dépendant (CFU-e). Enfin, les premières greffes de moelle osseuse allogéniques intrafamiliales HLA-identiques furent un succès rendant ainsi possible une reprise d'une érythropoïèse normale.

A partir des années 1990, les progrès réalisés dans le domaine de la génétique permirent l'initialisation de l'identification des gènes responsables de la maladie et la caractérisation des protéines impliquées. C'est ainsi qu'en 1999, le gène de la protéine ribosomique S19 (*RPS19*) fut identifié comme étant muté dans l'anémie de Blackfan-Diamond chez 25% des patients. A ce jour, de nombreux autres gènes ont été caractérisés et incriminés dans l'ABD mais la compréhension des mécanismes physiopathologiques responsables de la maladie est encore imparfaite.

II. Caractéristique phénotypique de la maladie

A. Aspect épidémiologique et présentation clinique de l'anémie de Blackfan-Diamond

1. Aspect épidémiologique

L'anémie de Blackfan-Diamond (ABD) est une maladie rare dont l'incidence est de 7 cas par million de naissances vivantes par an avec un sexe ratio égal à 1. La rareté de l'ABD rend difficile d'une part la création d'une centralisation des soins apportés aux patients et d'autre part la collecte de données cliniques et biologiques ainsi que leur utilisation. C'est pourquoi le développement de registres nationaux (Hôpital R. Debré, Paris), des centres de référence (Hôpital R. Debré, labellisé centre constitutif, Hôpital Saint Louis pour le centre de référence des aplasies médullaires (Pr R. Peffault de la Tour)), de laboratoire de référence (Hôpital R. Debré, dossier en cours) et la mise en place de collaborations scientifiques est essentiel pour la prise en charge et la compréhension de la physiopathologie de l'ABD. Depuis de longues années, l'équipe de recherche a développé de nombreuses collaborations nationales et internationales. En 2012, grâce à un financement européen e-RARE, un consortium constitué initialement de la Hollande (A. MacInnes, coordinatrice), de l'Allemagne (M. Wlodarski) et lde a France (L. Da Costa) a permis la création de l'EuroDBA (pour consortium européen de l'anémie de Blackfan-Diamond). En 2016, un nouveau financement permit d'étendre le groupe à la Turquie, l'Israël, et la Pologne. Cela a donné lieu à la constitution de nouveaux registres de patients, à la diffusion des guidelines sur la prise en charge thérapeuthique, au développement des méthodes de diagnostic moléculaire, à de nouvelles collections de prélèvements, à la constitution d'une banque de lymphocytes immortalisés EBV à partir de cellules de patients et enfin au développement de collaborations scientifiques internationales. Ce consortium a également permis d'identifier et caractériser de nouveaux gènes candidats chez les patients ne présentant jusqu'ici aucune mutation dans un des gènes connus comme étant liés à l'ABD. C'est dans ce cadre que la thèse de Sciences présentée ici se situe.

Alors que le registre européen compte plus de 1 500 patients dont 337 cas en Allemagne, 410 en France et 280 en Italie, le registre américain en dénombre 773, celui de la Russie 90 et celui de la Chine 104. La cohorte française des patients est désormais la plus importante d'Europe grâce à un long travail pour collecter tous les patients de France métropolitaine. Cette cohorte a été créée par le Pr Gil Tchernia en 1995 puis repris en 2003 par le Dr Thierry Leblanc

– référant clinique - assurant la partie clinique avec la possibilité de consultations pédiatriques et adultes et le Pr Lydie Da Costa – référent biologique - réalisant la partie du diagnostic biologique et le banking au laboratoire d'Hématologie de l'hôpital Robert Debré. Le diagnostic repose essentiellement sur l'analyse du myélogramme et le diagnostic moléculaire par des techniques de séquençage de moyen et haut débit (NGS, séquençage d'exomes), de séquençage Sanger chez les apparentés et des techniques de cytogénétique (développement de puces custom de CGH/SNP array). Le séquençage d'exomes est effectué au terme d'un bilan NGS et CGH/SNP array négatif sur la plateforme de l'Institut Imagine (Dr C. Bole, ANR DBA multigènes et e-RARE euro-DBA II et Labex GR-Ex). De plus, une activité de banking est associée afin de recenser tous les cas de patients atteints (Lydie Da Costa et al., 2018). Le registre a été informatisé (OFABD) grâce à l'obtention d'un PHRC (L. Da Costa en 2008, renouvelé en 2012).

2. Aspect clinique

L'ABD se révèle le plus souvent tôt dans l'enfance, généralement chez des nourrissons avec un âge médian au diagnostic de 8 semaines, et avant l'âge de 2 ans dans 95% des cas (Narla, Vlachos, & Nathan, 2011; T.-N. Willig et al., 1999). Il est estimé qu'avant l'âge de 5 ans, 99% des cas sont diagnostiqués. Dans 16% des cas, l'ABD se révèle à la naissance et des cas d'anasarques foeto-placentaires sont également rapportés (Lydie Da Costa et al., 2013; Wlodarski et al., 2018)

La maladie se manifeste le plus souvent par les signes cliniques caractéristiques de l'anémie chez le nourrisson tels qu'une pâleur cutanée, une dyspnée, une fatigue et une difficulté d'alimentation (tétée, biberon). Dans environ 50% des cas, l'anémie s'associe à des malformations congénitales variées plus ou moins sévères (tableau 1), et dans 25% des cas, le patient en possède au moins deux (Clinton & Gazda, 2019). Ces malformations incluent préférentiellement l'aire céphalique dans 50% des cas (microcéphalie, microrétrognathie, fente labiale ou palatine, hypertélorisme, etc…), les extrémités des membres dans 38% des cas (pouces triphalangés, surnuméraires, etc…), les zones urogénitales dans 39% des cas (absence du rein, hypospadias, ect…) ainsi que des anomalies cardiaques dans 30% des cas (défaut septal ventriculaire ou auriculaire, etc…)(Willig ped research1999; Vlachos et al., 2001 ; Lipton et al., 2006 ; O'Brien et al., 2017 ; Lipton & Ellis, 2009 ; Clinton & Gazda, 2019). De plus, il a

été rapporté que 30 % des patients présentent également un retard de croissance pouvant, par la suite, être aggravé par les effets secondaires des traitements par corticoïdes ainsi que l'excès de fer lié aux transfusions sanguines répétées en absence d'une chélation efficace.

ZONES PREFERENTIELMENT TOUCHEES	MALFORMATIONS CONGENITALES OBSERVEES
Aire céphalique	○ Hypertélorisme ○ Pont nasal large et plat ○ Fente palatine ○ Palais très arqué ○ Microcéphalie ○ Micrognathie ○ Oreilles basses ○ Ligne de cheveu basse ○ Epicanthus ○ Ptosis
Aire ophtalmique	○ Glaucome congénital ○ Strabisme ○ Cataracte congénitale
Zone du cou	○ Cou court ○ Cou palmé ○ Déformation de Sprengel ○ Déformation de Klippel-Feil
Extrémités des membres principalement le pouce	○ Pouce triphalangien ○ Pouce duplex ou bifide ○ Pouce hypoplasique ○ Éminence thénarienne plate
Aire urogénitale	○ Absence de rein ○ Rein en fer à cheval ○ Hypospadia
Aire cardiaque	○ Défaut septal ventriculaire ○ Défaut septal auriculaire ○ Coarctation de l'aorte ○ Anomalies cardiaques complexes
Autres troubles musculo-squelettiques	○ Retard de croissance ○ Syndactylie
Zone neuromotrice	○ Difficulté d'apprentissage

Tableau 1: Les diverses malformations les plus caractéristiques observées dans l'Anémie de Blackfan-Diamond (d'après Clinton & Gazda., 2019)

B. Aspect biologique de l'ABD

1. Erythroblastopénie

a. NFS et réticulocytes

Le premier test faisant suite au recueil des antécédents familiaux et à l'examen clinique complet consiste en une numération de la formule sanguine avec une numération des réticulocytes et un frottis sanguin. L'anémie de Blackfan-Diamond peut être suspectée lorsque la concentration de l'hémoglobine (Hb) est basse (inférieure à la normale pour l'âge et le sexe) accompagnée souvent d'une macrocytose (augmentation de la taille des globules rouges >98fl chez l'adulte) et d'un nombre de réticulocytes absents ou faibles (inférieur à 20 X 10^9/L) (anémie classiquement macrocytaire et arégénérative). Le nombre et la morphologie des leucocytes et des plaquettes sont le plus souvent normaux bien qu'il existe dans certains cas, au diagnostic, une thrombocytose (augmentation du nombre de plaquettes) ou à l'inverse une thrombocytopénie (diminution du nombre de plaquettes) ou encore une neutropénie (diminution du nombre de polynucléaires neutrophiles).

b. Le myélogramme

Chez un patient atteint d'ABD, l'analyse au microscope d'un frottis médullaire coloré montre une érythroblastopénie caractérisée par l'absence ou moins de 5% des précurseurs érythroïdes au sein de la moelle qui est par ailleurs normocellulaire.

2. La conservation de caractéristiques fœtales de l'érythropoïèse

Une persistance d'une hémoglobine de type fœtale (Hb F) qui normalement diminue progressivement de la naissance aux premiers mois de vie est observée. Dans l'ABD, la persistance de l'Hb F, avec notamment un taux anormalement élevé (5% à 25% à l'âge de 6 mois contre une norme inférieure à 1% à cet âge) est classique mais n'est cependant pas un marqueur spécifique. En effet, elle est également retrouvée dans d'autres insuffisances médullaires (Fargo et al., 2013). Pareillement, l'antigène i normalement présent sur les globules rouges de sang de cordon placentaire et disparaissant au profit de l'antigène I au cours de la première année de vie, persiste également de manière anormale à la surface des érythrocytes des patients.

3. L'adénosine désaminase érythrocytaire (eADA)

Par ailleurs, 90% des patients appartenant au registre français non transfusés ont une élévation de leur adénosine désaminase érythrocytaire (eADA) avec une concentration pouvant atteindre 2.20 ± 0.77 UI/g d'hémoglobine comparée à une concentration chez les sujets contrôles de 0.58 ± 0.21 UI/g d'hémoglobine. Il s'agit d'une enzyme clé de la voie des purines permettant d'un côté la désamination de l'adénosine en inosine et d'un autre côté celle de la 2'deoxyadénosine en 2'deoxyinosine. Cette enzyme est décrite pour la première fois comme étant élevée dans les érythrocytes de patients atteints d'ABD en 1983. Il a été observé que l'élévation de l'eADA est un marqueur prédictif d'ABD, spécifique à la maladie au regard des autres IBMFS (Fargo et al., 2013 ; Glader & Backer, 1988). Les familles pour lesquelles un des parents a une élévation de l'enzyme eADA sont considérées comme des familles à transmission dominante et le parent ayant cette élévation sans aucun autre symptôme est considéré comme un phénotype silencieux (T. N. Willig et al., 1998). A ce jour, la raison pour laquelle l'eADA est élevée dans l'ABD est encore inexpliquée.

La découverte d'un gène impliqué dans l'ABD est un critère diagnostique important qui sera détaillée par la suite. Le tableau 2 résume les critères cliniques et biologiques de l'ABD.

CRITERES DE DIAGNOSTIC PRINCIPAUX
○ Âge au diagnostic inférieur à 1 an ○ Anémie macrocytaire ○ Erythroblastopénie isolée au sein d'une moelle osseuse par ailleurs d'aspect normale sur les autres lignées ○ Réticulocytopénie importante (arégénération)
CRITERES MAJEURS DE SUPPORT AU DIAGNOSTIC
○ Présence de mutation dans un des gènes décrits comme « classique » responsable de l'ABD (cf paragraphe génétique) ○ Histoire familiale positive
CRITERES MINEURS DE SUPPORT AU DIAGNOSTIC
○ eADA élevée ○ Une ou plusieurs anomalies congénitales décrites au cours de l'ABD ○ HbF élevée ○ Absence d'élément en faveur d'une autre insuffisance médullaire

Tableau 2 : Critères de diagnostiques de l'ABD adapté selon Vlachos et al., 2008

C. Les traitements actuels et les traitements innovants en développement pour l'ABD

Le choix du traitement administré dépend de plusieurs critères : la tolérance de l'anémie, la réponse aux glucocorticoïdes, l'existence d'un donneur HLA-identique et le pays de résidence du patient. Un consensus a été obtenu pour le traitement de la maladie (guidelines de l'ABD consensus conférence, Maria Daniella Arturi Fondation, New York 2008). A ce jour, il existe trois traitements principalement utilisés.

1. Les traitements actuels de l'anémie de Blackfan-Diamond

a. Les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes appartiennent à la famille des corticostéroïdes. Il s'agit d'une hormone naturelle synthétisée par les glandes surrénales à partir du cholestérol, connue comme appartenant à la catégorie des anti-inflammatoires parmi les plus puissants.

Le premier succès de l'utilisation des GC fut noté en 1951 par Gasser (Gasser C, 1951). De nos jours, le traitement thérapeutique par les glucocorticoïdes est encore la première ligne du traitement médical après la transfusion. Environ 60 à 80% des patients y répondent positivement avec une amélioration de la concentration de l'hémoglobine observée entre deux et quatre semaines après l'administration des GC (Narla, Vlachos, et al., 2011). Il est recommandé de ne pas administrer ce traitement avant la première année de vie du patient pour laisser l'avantage de la croissance de la première année de vie. La corticothérapie est débutée à une dose de 2 mg/kg/jour. Si le patient répond au traitement la dose de corticoïdes est diminuée progressivement jusqu'à atteindre la dose minimale permettant de maintenir une concentration en hémoglobine stable. Cette dose doit être quoiqu'il arrive <0.3 mg/kg/J pour minimiser les effets secondaires de la corticothérapie à des doses inadaptées qui sont constatées chez environ 20% des patients. Ces effets secondaires peuvent être divers tels qu'une hypertension, un diabète, un retard de croissance, des fractures osseuses, des infections, une cataracte ou des troubles du comportement (Narla, Vlachos, et al., 2011). En cas de cortico-résistance ou de corticoïdes ne pouvant pas être maintenus à une dose <0.3 mg/kg/J, le patient est transfusé régulièrement avec - après un certain nombre de transfusions et selon la ferritine - des chélateurs en fer. La dose des GC prescrit varie considérablement entre chaque patient bon répondeur. Cependant, seulement 40% des patients répondent au traitement sur le long terme et certains

patients considérés comme « bons répondeurs » peuvent à tout moment ne plus répondre à ce traitement (Narla, Vlachos, et al., 2011). Le mécanisme d'action des glucocorticoïdes dans l'ABD ainsi que la variation des réponses au traitement restent encore mal compris. En effet, le mode d'action des GC est particulièrement obscur dans l'anémie de Blackfan-Diamond. Plusieurs études ont démontré une apoptose des progéniteurs érythroïdes au cours de la maladie due une stabilisation de la protéine p53 (Clinton & Gazda, 2019; L. Da Costa et al., 2010; Lipton et al., 2006) . Les glucocorticoïdes semblent avoir un effet anti-apoptotique non spécifique chez ces progéniteurs, en particulier au niveau des CFU-e et des proérythroblastes (Diamond, Wang, & Alter, 1976), et pourraient donc favoriser la survie cellulaire. Ils améliorent partiellement la sensibilité des érythroblastes à l'érythropoïétine de par leur fixation à l'EPOR favorisant ainsi le rapprochement avec le récepteur au SCF. Ce rapprochement induit ainsi une synergie conduisant à une augmentation de la prolifération et de la survie des progéniteurs érythroïdes aux stades BFU-e et CFU-e (Vlachos et al., 2001). Chez la souris, une inhibition de la dimérisation du récepteur aux GC conduit à une absence d'érythropoïèse de stress en cas d'anémie hémolytique soulignant le rôle régulateur des glucocorticoïdes sur ce type d'érythropoïèse (Bauer et al., 1999). De même, il a été montré chez la souris invalidée pour *rps19* qu'un traitement aux glucocorticoïdes (prednisolone ou dexaméthasone) corrige l'anémie. En effet, la dexaméthasone induit, en se fixant sur ses récepteurs, la dégradation de la protéine p53 par le protéasome (Fargo et al., 2013). Chez ces souris, la prolifération des cellules BFU-e et CFU-e est améliorée par le traitement et la différenciation érythroïde est restaurée. De plus, suite à un traitement à la dexaméthasone, une réduction de la transcription des gènes activés par la p53 est observée. Enfin, une étude a montré que le nombre de BFU-e et CFU-e issues de moelle osseuse de patients atteints de l'anémie de Blackfan-Diamond est diminué chez les patients transfusés contrairement aux patients traités avec des corticostéroïdes Par ailleurs, les corticostéroïdes entraînent une augmentation du nombre de BFU-e (Glader & Backer, 1988 ; Narla A., 2011).

Les récepteurs aux glucocorticoïdes non fixés par leur ligand se retrouvent dans le cytoplasme cellulaire liés aux protéines chaperons. En cas de fixation des GC à leur récepteur, la liaison des protéines chaperons se rompt. Le récepteur se dimérise et est transloqué au noyau par un signal de localisation nucléaire où il régule la transcription de gènes possédant une séquence d'ADN spécifique nommée « glucocorticoïd receptor responsive element » (GRE) (Kellendonk et al., 1999). Les gènes *Zfp3612* – jouant un rôle dans la prolifération des progéniteurs BFU-e (Lingbo Zhang et al., 2013) et *Myb* – impliquée dans la prolifération des

érythroblastes (Barnes, 2006) – sont des exemples de gènes pouvant être régulés par une fixation du GC à son récepteur. L'action des glucocorticoïdes passe par la voie NF-κB et favorise une réaction anti-inflammatoire (Barnes, 2006).

b. La transfusion sanguine

Pendant la première année de vie ainsi que pour les patients réfractaires au traitement par les glucocorticoïdes ou étant sensibles mais à des doses trop élevées (supérieurs à 0,3 mg/kg/J) faisant courir un risque de complications iatrogènes secondaires, l'utilisation de transfusions sanguines régulières associées à un traitement chélateur en fer (déférasirox, déféroxamine, défériprone) reste l'option thérapeutique préconisée.

Cependant, la thérapie transfusionnelle chronique a pour effet d'induire de nombreux inconvénients tels qu'une exposition répétée à des produits sanguins labiles, un accès par voie intraveineuse et une surcharge en fer. Cette dernière est un problème sérieux pour les patients atteints d'ABD recevant des transfusions régulières d'où l'importance d'utiliser de chélateurs en fer. En effet, ils permettent d'éviter une surcharge en fer au niveau du foie, du cœur, du pancréas ou des glandes endocrines) pouvant induire une hémochromatose secondaire. C'est pourquoi il est important d'évaluer la surcharge en fer en dosant la ferritine, protéine majoritaire du stockage du fer dans l'organisme, et en réalisant des IRM hépatique et cardiaque.

c. La greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques

A l'heure actuelle, la greffe allogénique (allogreffe) de cellules souches hématopoïétiques (CSHs) HLA-identique intra-familiale et plus récemment via un donneur non apparenté est la seule option curative pour les manifestations hématologiques de la maladie. Les CSHs sont issues de cellules souches périphériques, de moelle osseuse ou de sang de cordon placentaire. Elle est préconisée dès lors qu'un donneur HLA identique intrafamilial existe. L'allogreffe de CSHs peut être recommandée pour les patients ayant reçu de nombreuses transfusions à un très jeune âge. En France, l'allogreffe a longtemps été réservée aux formes grave d'ABD transfusion-dépendantes ou aux formes compliquées. Une étude réalisée sur 139 patients allogreffés a permis de définir un score de réussite d'allogreffe de CSHs en fonction de critères basiques : correspondance HLA, moment de la transplantation et âge (Devillier et al.,

2016). Le taux de réussite d'une allogreffe est plus important (supérieur à 90%) lorsqu'elle est pratiquée sur des patients de moins de 10 ans (Fagioli et al., 2014; Adrianna Vlachos & Muir, 2010). Certaines études ont également décrit un meilleur résultat chez des frères et sœurs HLA-compatibles (Fagioli et al., 2014; Roy et al., 2005). Depuis peu, des allogreffes de CSHs chez des donneurs non apparentés (sur fichier) ont été réalisées avec succès (De Latour, 2016). Malgré de nombreuses améliorations obtenues ces dernières années, l'allogreffe de CSHs est associée à une morbi-mortalité importante, notamment du fait d'infections ou de la « maladie du greffon contre l'hôte » aiguë et/ou chronique (GVH pour graft versus host disease), en particulier avec des donneurs HLA haplo-identique.

Il semble intéressant de constater qu'une allogreffe de CSHs permet la guérison de l'anémie. Cela peut suggérer l'efficacité potentielle de la thérapie génique sur les CSHs pour le traitement de l'ABD.

2. Les traitements innovants en développement

a. Thérapie génique

La thérapie génique peut être définie comme une introduction de matériel génétique modifié dans des cellules de patients à des fins thérapeutiques. Concrètement, il s'agit de livrer une version de type sauvage du gène d'intérêt à des cellules cibles dans la finalité de surmonter le défaut génétique intrinsèque. Les récents progrès dans le développement des systèmes de vecteurs viraux ont permis d'améliorer la sécurité du transfert de gènes. De plus, ces progrès ont conduit à des succès cliniques majeurs (Kumar et al.,2016). Des résultats ont été obtenus par transfert de gènes *ex vivo* dans des CSHs pour le traitement de troubles hématologiques et neurodégénératifs (Naldini, 2015).

Des progrès considérables ont également été effectués dans la thérapie génique de la β-thalassémie et de la drépanocytose (Cavazzana-Calvo et al., 2010; Negre et al., 2016). De plus, trois essais cliniques sur des patients atteints d'anémie de Fanconi sont en cours afin d'évaluer l'innocuité et l'efficacité du traitement par vecteurs lentiviraux porteurs du gène *FANCA*. Il y a actuellement des études de faisabilité de thérapie génique pour l'anémie de Blackfan-Diamond. Tout ceci démontre que l'utilisation de la thérapie génique pour les syndromes d'insuffisance médullaire est envisageable.

- Vecteur lentiviral

L'utilisation d'un vecteur lentiviral permet d'assurer une grande efficacité dans la transmission des gènes. Le vecteurs adénoviral est le plus utilisé. Cependant, l'immunité préexistante contre lui est très courante dans la population (C. S. Lee et al., 2017). De plus, le gène *trans* n'intègre pas le génome de l'hôte. Au cours du temps, son expression est diluée suite à la prolifération cellulaire mais l'injection multiple de vecteurs adénoviraux n'est pas recommandée en raison de leur importante immunogénicité. A l'inverse, les vecteurs rétroviraux et lentiviraux permettent l'intégration du transgène dans le génome de l'hôte induisant une expression stable de celui-ci. Malheureusement, leur utilisation présente des risques d'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs ou d'activation des proto-oncogènes, tous deux pouvant stimuler la carcinogénèse (Biasco e al., 2018; Poletti & Mavilio, 2018).

Dans le passé, plusieurs études évaluèrent la faisabilité de la thérapie génique pour les patients atteint d'anémie de Blackfan-Diamond en utilisant une expression forcée de RPS19, gène le plus fréquemment muté. Cette approche permit de réverser le phénotype de l'ABD caractérisé par un défaut de maturation de l'ARN ribosomique, de la synthèse protéique ainsi que de la prolifération cellulaire et de la stabilisation de la protéine p53 (Aspesi et al., 2018). Il a été démontré par l'utilisation de cellules $CD34^+$ transplantées chez souris qu'un niveau élevé de l'expression de la protéine RPS19 conférait un avantage dans la survie cellulaire des cellules transplantées et favorisait donc une prise de greffe (Flygare et al., 2008).

- Une future stratégie d'édition du génome : le CRISPR/Cas9

L'outil le plus récent et prometteur d'édition du génome est le CRISPR/Cas9. A la place de protéines modifiées, ce nouveau système utilise un ARN guide conçu pour s'hybrider sur un site génomique spécifique. Une simple modification de la courte séquence de l'ARN guide permet de cibler n'importe quel gène d'intérêt. L'utilisation du CRISPR/Cas9 est rapide, simple et efficace expliquant pourquoi de nombreux groupes de recherche ont employé cet outil pour corriger les mutations de la thalassémie dans les IPSCs dérivées de patients (Cai et al., 2018; Song et al., 2015; P. Xu et al., 2015). De même, des IPSCs et des fibroblastes de patients atteints d'Anémie de Fanconi ont pu être récupérés par cette technique (Osborn et al., 2016; Skvarova

Kramarzova et al., 2017). Bien qu'il n'existe pas encore de données expérimentales sur la faisabilité de l'édition génétique dans l'ABD, cette technologie semble prometteuse.

b. Les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs)

La reprogrammation des cellules matures représente une évolution vers la thérapie personnalisée. Le risque d'un rejet immunitaire et toutes préoccupations éthiques liées à l'utilisation de cellules embryonnaires sont éludés. De surcroît, les iPSCs peuvent être une source illimitée de cellules autologues. Elles sont génétiquement maniables, se différencient et se spécialisent puis sont caractérisées avant toute greffe. Des iPSCs ont été obtenues à partir de fibroblastes de patients atteints d'ABD porteurs d'une mutation de RPL5 ou RPS19, apportant un approvisionnement renouvelable de cellules possédant des défauts ribosomiques et érythroïdes (Garçon et al., 2013). Une analyse transcriptomique de ces iPSCs a montré un dérèglement de la voie de signalisation du facteur de croissance transformant β (TGFβ).

c. Petites molécules

Dans la finalité de découvrir de nouvelles molécules capables de stimuler l'érythropoïèse, un criblage chimique a été réalisé. Initialement identifié comme un inducteur de l'autophagie dans un modèle de maladie neurodégénérative (Dutt et al., 2011; Parrella et al., 2014), et augmentant la synthèse des autophagosomes (Sarkar et al., 2007; Tian et al., 2011), SMER28 a été identifié comme un potentiel agent thérapeutique (Doulatov et al., 2017). Il a été montré que SMER28 augmente le nombre de cellules érythroïdes $CD71^+$ $GlyA^+$ dans les iPSCs dérivées de patients porteurs d'une mutation dans les gènes *RPS19* ou *RPL5*. SMER28 ne perturbe pas les autres lignées hématopoïétiques. Il induit l'autophagie durant la différenciation érythroïde en agissant sur les progéniteurs $CD34^+$. L'autophagie est une voie de survie cellulaire induite par un stress tel une limitation nutritive ou un agrégat protéique. En outre, l'autophagie joue un rôle dans la clairance mitochondriale au cours de la différenciation érythroïde terminale (Porter et al., 2014). Le processus autophagique possède des rôles importants dans le développement, l'homéostasie et la cancérogenèse (Peffault De Latour et al., 2015; Roy et al., 2005). L'expression des gènes autophages est directement activée par le régulateur principal érythroïde GATA-1 (Ostronoff et al., 2004). SMER28 présente le plus grand effet dose-

dépendant sur la différenciation érythroïde. Pour cela, il agit via le facteur d'autophagie ATG5. Ce dernier joue un rôle important dans l'érythropoïèse en médiant l'autophagie canonique et en augmentant l'expression de la globine dont l'expression est diminuée au cours de l'ABD (Rio et al., 2019; J. Xu et al., 2018). Ainsi, SMER28 augmente le flux autophagique dans les cellules érythroïdes et la perte de ATG5 - requis pour l'assemblage de l'autophagosome – bloque les effets de SMER28 sur l'érythropoïèse. Les résultats de cette étude suggèrent un défaut de renouvellement autophagique.

Cependant, en 2014, une étude a mis en évidence que l'inactivation du gène *RPS*19 induit une activité accrue de l'autophagie dans l'anémie de Blackfan-Diamond. Cette observation a également été observée chez les cellules $CD34^+$ issues de patient atteints d'ABD possédant une mutation *RPS*19 ainsi que dans les globules rouges des embryons de poissons zèbres présentent un déficit en RP (Heijnen et al., 2014).

D. L'évolution clinique de l'anémie de Blackfan-Diamond

L'évolution clinique de la maladie est imprévisible. Les diverses complications rapportées au cours de l'ABD peuvent être soit liées à la maladie soit aux effets secondaires des traitements (utilisation à long terme des corticoïdes ou hémochromatose secondaire due aux nombreuses transfusions). Parmi les complications rares, le risque de malignité a été récemment évalué à 4,8% (Vlachos et al., 2018) (Alter et al., 2010; Vlachos et al., 2012). Dans le registre français, ce risque de malignité est à 6%. Les enfants atteints d'ABD ont plus de risque de développer des cancers solides (hépatiques, rénaux, colorectaux et osseux avec une fréquence non négligeable d'ostéosarcomes) ou des hémopathies malignes (leucémie aiguë myéloblastique ou lymphoblastique, lymphomes ou syndromes myélodysplasiques). Des cancers colorectaux sont observés chez les patients (Lipton et al., 2001; Shimamura & Alter, 2010; Vlachos et al., 2012 ; Vlachos et al., 2018). Une étude chez la souris a mis en évidence qu'une haploinsuffisance en *rpl11* conduit à une prédisposition à la lymphomogenèse (Morgado-Palacin et al., 2015). De plus, des souris happloinsufissantes en *Rpl5* ou *Rps24* présentent une prédisposition au sarcome (Kazerounian et al., 2016). Cette augmentation du nombre de cas de cancers peut se justifier par une meilleure connaissance de la maladie, un meilleur diagnostic (augmentation du nombre de cas étudiés) et un allongement de la durée de

vie des patients. Il est cependant impossible de faire abstraction à la fois des facteurs environnementaux et des facteurs exogènes. Par ailleurs, la découverte de mutations activatrices du gène *p53* au cours de l'anémie de Blackfan-Diamond conforte un lien fort entre la maladie et les processus cancéreux (Toki et al., 2018). Cependant, les mécanismes qui concourent à la survenue de ces malignités restent encore non élucidés. Néanmoins, le risque global de malignité est moins élevé chez les patients ABD que pour les autres insuffisances médullaires (Vlachos et al., 2012).

Il existe d'autres complications rares de l'ABD comme l'aplasie médullaire (correspond à un arrêt de la production par la moelle osseuse des différentes lignées sanguines).

Chez les femmes atteintes d'ABD, il existe un risque de complications graves au cours des grossesses. Le suivi de grossesse doit être réalisé dans une maternité de niveau 3 minimum avec un suivi rapproché multidisciplinaire. Parmi ces grossesses, 66% développent des complications (prééclampsie, retard de croissance du fœtus, prématurité, fausses couches à répétition, mort fœtale). D'après une étude rétrospective du registre français, seulement la moitié des grossesses de femmes atteintes d'ABD aboutissent à une naissance (Faivre et al., 2006).

III. Caractéristiques génétiques de la maladie

L'anémie de Blackfan-Diamond est une maladie héréditaire, le plus souvent à transmission autosomale et sporadique. Les formes familiales (45% des cas) ont une transmission dominante (Gazda et al., 2012) alors que dans près de 55% des cas, la maladie est sporadique. La transmission d'une maladie est dite sporadique ou *de novo* lorsqu'aucun des 2 parents biologiques ne porte la variation allélique identifiée chez le propositus. Par la suite, la transmission à la descendance se fait avec un risque de 50% à chaque grossesse (néomutation dominante).

A. Le premier gène découvert : la protéine ribosomique RPS19

Il fut découvert en 1997 lors d'une étude d'un caryotype anormal avec une translocation équilibrée entre les chromosomes X et 19 (t(X;19)(p21;q13) chez une patiente suédoise. Deux ans plus tard, le gène fut identifié pour coder la protéine ribosomique RPS19 (Draptchinskaia

et al., 1999). Le gène *RPS19* a une expression ubiquitaire et est très conservé au cours de l'évolution. Constitué de six exons dont le premier n'est pas codant et de 2 zones promotrices, le gène *RPS19* a été localisé chez l'Homme sur le chromosome 19. Il code pour une protéine de 16 kDa, RPS19, constituée de 145 acides aminés dont la forme endogène est majoritairement localisée au niveau du nucléole (Da Costa et al., 2003) (figure 20). La protéine RPS19 appartient à la famille des protéines ribosomiques (RP) dont on dénombre 78 membres. Il s'agit d'une protéine de la petite sous-unité 40S du ribosome (O'Donohue et al., 2010). Le ribosome est le complexe ribonucléoprotéique garant de la synthèse protéique au sein de la cellule. La protéine RPS19 interagit avec plusieurs partenaires protéiques tels que Pim-1, une sérine thréonine kinase étant également un proto-oncogène (Chiocchetti et al., 2005; Hogan et al., 2008), RPS19BP1 qui inhibe l'activité de p53/TP53 (Bachmann & Möröy, 2005; E. J. Kim, Kho, Kang, & Um, 2007) et FGF-2 (fibroblast growth factor 2) (Soulet et al., 2001). La protéine RPS19 est phosphorylée par Pim-1 exprimée ubiquitairement et au niveau du tissu hématopoïétique (Bachmann & Möröy, 2005). Pim-1 joue un rôle dans la voie de la protéine STAT5, activée par le récepteur à l'EPO. Elle agit en parallèle d'AKT pour garantir la survie cellulaire et la prolifération (Amaravadi & Thompson, 2005; Peltola et al., 2004).
La cristallisation de la protéine RPS19 de *Pyrococcus abyssi*, une archéobactérie, a mis en évidence une structure de la protéine en cinq hélices α toutes organisées autour d'une hélice centrale amphipatique protéine (L. A. Gregory et al., 2007).

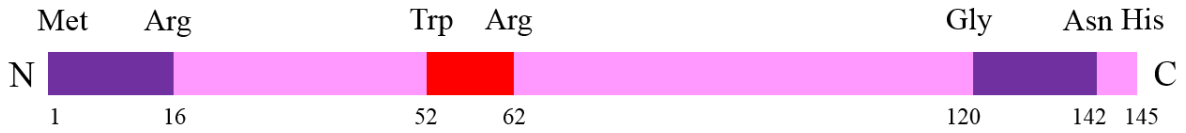


Figure 20 : Schéma de la protéine RPS19. La protéine RPS19 constitué de 145 acides aminés présente une région « Hot Spot » (rouge) et des parties NoS (en violet) en N et C terminales (illustration d'après Da Costa)**.**

L'ensemble des registres internationaux permet d'estimer à 25% le nombre de patients possédant une mutation sur ce gène (Campagnoli et al., 2008a; R. Cmejla et al., 2000; Ramenghi et al., 2000; Thiébaut Noël Willig et al., 1999). Les différentes mutations identifiées sont toutes hétérozygotes. Les mutations à l'état homozygote de ce gène sont réputées létales (Ball &

Orfali, 2004; Campagnoli et al., 2008b; R. Cmejla et al., 2000; Draptchinskaia et al., 1999). Néanmoins, tous les types de mutations sont observés : mutations ponctuelles faux-sens, non-sens, délétions, insertions, mutations induisant un défaut d'épissage alternatif. Les mutations peuvent être localisées sur chacun des 6 exons du gène avec une zone préférentielle au niveau des codons 52 à 62, appelée également « Hot Spot »(T.-N. Willig et al., 1999) (figure 20). D'autres mutations instables de RPS19 – catégorisées de classe I - ont mis en évidence leur impact sur le repliement de la protéine et par conséquent sa stabilité. De plus, leurs effets sur la localisation cellulaire de la protéine, dans ce cas majoritairement cytoplasmique accompagnée d'une diminution de l'expression protéique, ont été constatés. Ces mutants décelés sur les hélices α1, α3 et α6 ainsi qu'à l'intérieur de la structure de RPS19 affectent de manière importante la structure de la protéine (L. A. Gregory et al., 2007). Cela explique pourquoi ces mutants instables sont dégradés par le protéasome (Crétien et al., 2008). A l'inverse, les mutations de RPS19 affectant la région « Hot Spot » - appartenant à la classe II - codent pour une protéine dont la localisation n'est pas perturbée et reste principalement nucléolaire avec une expression protéique conservée (Crétien et al., 2008). Ces mutations se localisent à la surface de l'hélice α3, au centre de la structure tridimensionnelle de la protéine, potentiellement en contact avec d'autres protéines. Dans ce cas, la protéine perd sa fonction mais son repliement général reste le même (L. A. Gregory et al., 2007). Enfin, dans les régions non codantes du gène, une association de 4 polymorphismes SNP (Single Nucleotide Polymorphism) constituant un bloc d'haplotype a été décrite. Bien que leur rôle au cours de la maladie ne soit pas établi, il est toutefois possible qu'ils interviennent dans la pathogénicité de l'ABD (Crétien et al., 2010).

Bien que les protéines RPS19 chez l'Homme et chez Pyrococcus partagent seulement 36% d'identité et 57% de similarité, les informations procurées chez l'archéobactérie permettent d'apporter un élément de réponse quant à la structure de la protéine et aux différences observées dans la localisation et l'expression des différents mutants identifiés.

B. Les autres gènes de protéines ribosomiques

Depuis la découverte du gène *RPS19*, de nombreux autres gènes codant pour des protéines ribosomiques ont été identifiés. La fréquence des mutations est bien moindre que celle du gène *RPS19*. Le second gène identifié est *RPS24* en 2006 (Gazda et al., 2006) suivi du gène *RPS17* en 2007 (Cmejla et al., 2007) et de 4 autres gènes en 2008 : *RPL35a* (Farrar et al., 2008),

RPL5, RPS7 et *RPL11* (Gazda et al., 2008). D'autres études ont suivi et ont mis en évidence cette particularité de la maladie à être associée à des gènes de RP : *RPS10, RPS26* (Doherty et al., 2010), *RPL26* (Gazda et al., 2012), *RPL15* (Landowski et al., 2013), *RPS29* (Mirabello et al., 2014), *RPS28* (Gripp et al., 2014), *RPS27* et *RPL27* (R. Wang et al., 2015). Des études menées par diverses équipes internationales ont identifié de grandes délétions au sein des gènes de RP déjà répertoriés comme gènes candidats. Il s'agit principalement des gènes *RPS19, RPL5, RPL11, RPS17, RPL35a* (Farrar et al., 2008; Kuramitsu et al., 2012; Quarello et al., 2012).

A ce jour, 20 gènes de RP ont été retrouvés mutés chez les patients atteints d'ABD avec des fréquences très variables. Ces mutations sont retrouvées chez 70 à 80% des patients. A noter que 90% des mutations sont retrouvées uniquement dans 6 gènes de RP (Lydie Da Costa et al., 2018) (tableau 3). Ainsi majoritairement, les gènes responsables de l'ABD codent pour des protéines ribosomiques appartenant soit à la petite sous-unité (40S) soit à la grande sous-unité (S60) du ribosome.

Les mutations des gènes de RP entraînent des défauts de maturation des ARN ribosomiques (ARNr) faisant de l'anémie de Blackfan-Diamond la première ribosomopathie décrite (Léger-Silvestre et al., 2005). Le niveau de l'atteinte dans la maturation des ARNr dépend du gène muté. Bien qu'il n'existe pas de corrélation entre phénotype/génotype pour les mutations de *RPS19*, il existe une différence significative dans la présence de malformations en fonction du gène de protéine ribosomique muté. Les patients porteurs de mutations dans le gène *RPS19* présentent classiquement le moins de malformations par rapport aux autres patients mutés sur d'autres gènes de RP. La majorité des patients possédant une mutation du gène *RPL5* (83%) ou *RPL11* (73%) présentent une ou plusieurs malformations (Ulirsch et al., 2019) affectant la zone ORL (fente palatine) et des malformations crânio-faciales pour *RPL5* (22%), cardiaques (13%), et des anomalies du pouce dont le pouce triphalangé pour *RPL11*(Radek Cmejla et al., 2009; Delaporta et al., 2014; Gazda et al., 2008; Quarello et al., 2010).
Des mutations de protéines possédant une fonction dans la biogenèse des ribosomes sont rapportées dans des troubles congénitaux non hématopoïétiques (tableau 4) et notamment dans les gènes *RPL9* et *RPL13* (cf suite de la thèse).

C. Le gène codant la protéine ribosomique RPL9 : un variant du gène potentiel non validé

La protéine ribosomique RPL9 est un des composants de la grande sous-unité 60S du ribosome, nécessaire à la synthèse protéique tout comme les autres RP. RPL9 est une protéine hautement conservée chez les mammifères (Mazuruk, Schoen, Chader, Iwata, & Rodriguez, 1996) et appartenant à la famille des protéines ribosomiques LP6. Le gène codant pour cette protéine de 196 acides aminés pour un poids moléculaire de 22 kDa (Suzuki, Olvera, & Wool, 1990) est situé sur le chromosome 4 et est constitué de 8 exons. Alors que chez l'adulte, la protéine est la plus exprimée au niveau des globules blancs, du système digestif, des différents tissus musculaires, chez l'embryon, elle est principalement exprimée dans le système musculo-squelettique (notamment les os) et le système hématopoïétique (amygdales). Des travaux ont suggéré que la protéine RPL9 induite par un stress soit impliquée dans la croissance non contrôlée et la survie cellulaire. Ces résultats obtenus sur des levures ont montré que RPL9 agit davantage comme un gène de RP anti-apoptotique (Eid et al., 2014). De plus, il existe plusieurs rapports selon lesquels le gène *RPL9* serait surexprimé dans le cancer colorectal par rapport au côlon normal (Mao-De & Jing, 2007; Zhang et al., 2015)(Yoon et al., 2006). En 2016, une nouvelle étude portant sur le rôle de la protéine RPL9 dans le cancer colorectal a montré qu'une inhibition de la protéine entraîne une diminution de la croissance cellulaire des cellules cancéreuses accompagnée d'une forte induction de l'apoptose. Les auteurs montrent par ailleurs que l'inhibition de RPL9 induit une diminution de la protéine PARP-1 et de la procaspase 3 ainsi que d'Id-1 qui est associée de manière fonctionnelle à l'activation de NF-κB. La protéine Id-1 est connue pour être impliquée dans la croissance et la différenciation cellulaire ainsi que la sénescence. L'inhibition de Id-1 dans des cellules de cancer colorectal entraîne une diminution de la prolifération, de la migration et de l'invasion cellulaire ainsi qu'une augmentation du taux d'apoptose (Lai et al., 2014). L'action de RPL9 est corrélée à l'axe de signalisation Id-1/NF-κB (Baik et al., 2016). Enfin, il a été mis en évidence que la protéine RPL9 est un partenaire de la protéine Gag dont la liaison aurait un rôle dans l'assemblage des particules virales de la tumeur mammaire de souris (Beyer et al., 2013).

A ce jour, une seule variation allélique (c.375G>C ; p.Arg125Ser) du gène *RPL9* avait été reportée dans l'anémie de Blackfan-Diamond. Cependant, cette variation a été déclarée de signification indéterminée puisqu'elle n'avait aucun effet sur la maturation des ARNr (Gazda et al., 2008).

Gène muté	Fréquence	Localisation	Rôle	Découvert
RPS19	25%	19q13	ARNr18S-E	Draptchinskaia 1999
RPL5	7%	1p22	ARNr5S, ARNr5.8S, ARNr12S, ARNr28S, RPL5-MDM2	Gazda 2008
RPS26	6,6%	12q13	ARNr18S	Doherty 2010
RPL11	5%	1p36	ARNr5S, ARNr5.8S, ARNr12S, ARNr28S, RPL11-MDM2	Gazda 2008
RPL35a	3%	3q29	ARNr12S, ARNr28S,	Farrar 2008
RPS10	3%	6p21	ARNr18S	Doherty 2010
RPS24	2,4%	10q22	ARNr21S	Gazda 2006
RPS17	1%	15q	ARNr18S	Cmejla 2007
RPL15	<1%	3p24.2		Landwoski 2013
RPS29	<1%	14q		Mirabello 2014
RPS7	<1%	2p25	RPS7-MDM2	Gazda 2008
RPS15	<1%	19p13.3		
RPS27a	<1%	2p16		
RPL9	<1%	4p13		Gazda 2008
RPL27	<1%	17q21		Wang 2015
RPL31	<1%	2q11.2		Farrar 2014
RPL36	<1%	19p13.3		Gazda 2008
RPL26	<1%	17p13		Gazda 2012
RPL3	<1%	22q13		Gazda 2012
RPL19	<1%	17q12		Gazda 2012
RPL23A	<1%	17q11.2	RPL23 MDM2	Gazda 2012
TSR2	<1%	Xp11.22		Gripp 2014
GATA1	<1%	Xp11.23		Sankaran 2012
EPO	<1%	7q22.1		Kim 2017

Tableau 3 : Les différents gènes mutés dans l'ABD.

Tableau 4 : récapitulatif de différentes ribosomopathies (D'après (Baßler & Hurt, 2019).

Ribosomopathie	Gènes mutés	Fonction du gène	Caractéristiques cliniques	Caractéristiques biologiques
Anémie Blackfan-Diamond	Happloinsuffisence en protéines ribosomales (RPS19; RPS24; RPS17; RPL35a; RPL5; RPL11; RPS7; RPS26 et autres…)	Protéines ribosomales requises pour la biogenèse du ribosome	malformations congénitales (crano-faciles, extrémités, organes), retard de croissance	Anémie macrocytaire, réticulocytopénie
Syndrome Shwachman-Diamond	SBDS 7q11,21 (90%) DNAJC21, ELF1	SBDS est un facteur de biogenèse du ribosome impliqué dans la maturation de la sous-unité 60S du ribosome et liaison des sous-unités 60S-40S	Insuffisance pancréatique, infections récurrentes, immunodéficience commune variable (CVID) Retard staturo-pondéral	Neutropénie, aplasie médullaire, thrombocytopénie, diminution des cellules B et immunoglobulines
Syndrome de Treacher Collins	TCOF1; POLR1D; POLR1C	Protéine nucléaire ayant un rôle dans le processus pré-ribosomal et la biogénèse du ribosome, Composant des ARN polymérase I et II	Anomalies crâniofaciales	Anémie, anomalies des cellules T, hypogammaglobulinémie
Syndrome 5q-	Happloinsuffisence de plusieurs gènesn incluant RPS14	Protéines ribosomales requises pour la biogénèse du ribosome	pâleur, anomalies des mégacaryoctes	Anémie macrocytaire, prédisposition pour la leucémie
Dyskératose congénitale liée au X (DKC)	TERC, DKC1; NOP10; NHP2; PARN	Association de protéine nucléolaire avec snoRNPs, Modification de l'ARNr, Composant du complexe télomérase	Hyperpigmentation de la peau, leucoplasies des muqueuses, dystrophie des ongles	Aplasie médullaire, longueur des télomères réduite, diminution du nombre de cellules B et d'IgM
Hypoplasie cartilage-cheveux ou chondroplasie métaphysaire de McKusick	RMRP	Composant (ARN) du complexe MRP-RNase, Clive le précurseur ARNr, rôle dans la réplication de l'ADN mitochondriale	Anomalies du squelette et du cartilage, anomalies des cheveux, infections récurrentes, retard staturo-pondéral (voire nanisme)	Neutropénie, lymphopénie, hypogammaglobulinémie, diminution du nombre de cellules T, défaut des cellules B
Cirrhose Nord-Amérindienne infantile (NAIC)	hUTP4 (CIRHIN (CIRH1A))	hUTP4 est un composant de la particule 90S	Ictère néonatal, cirrhose biliaire et hypertension	dysfonction hépatique
Asplénie congénitale isolée	RPSA	haploinsuffisance en protéine ribosomale SA, possibles infections bactériennes sévères	Absence de rate à la naissance	
Syndrome de Bowen-Conradi	Emg1 (Nep1)	Emg1 est un composant de la particule 90S. Emg1 catalyse la méthylation de la pseudouridine	retard de croissance, malformation cranio-faciales et des organes (rein, cœurs, et autres…)	
Syndrome de Roberts	ESCO1 (eco1)	Esco1 est une acétyltransférase importante pour l'assemblage de la cohésine. Affecte également l'assemblage des ribosomes. Le phénotype semble indépendant de p53	malformation des membres, retard de croissance	micronuclétion, aneuploïdie, noyau multilobulé
Syndrome d'alopécie-trouble neurologique progressif-endocrinopathie (Syndrome ANE)	RBM28 (hNop4)	Impliqué dans la biogenèse de la 60S	Alopécie, hyperpigmentation de la peau, réduction de la fonction hypophysaire, retard mental	réponse anormal au test de stimulation ACTH, diminution du taux IGF-1, déficience en hormone de croissance
Syndrome de Williams-Beuren	Délétion de 1,5 Mb sur 7q11.23	Suppression de plusieurs gènes comprenant WBSCR20 (homologue Nol1, Nop2) et la méthyltransférase WBSCR22 qui participent à la biogenèse du ribosome	cardiopathie congénitale, déficience cognitive, malformations cranio-faciales	hypercalcémie, anomalies du tissus conjonctif

D. De nouveaux gènes identifiés dans la maladie : des gènes qui ne sont pas des gènes de RP

Depuis 2012, trois gènes non de RP ont été retrouvés mutés dans l'anémie de Blackfan-Diamond. Il s'agit du gène *GATA-1*, du gène *TSR2* et du gène *EPO*.

1. Le gène GATA-1

Six familles dans le monde ont été décrites porteuses de mutations dans le gène *GATA-1* : trois patients américains (Sankaran et al., 2012), un patient italien (Parrella et al., 2014), un patient suédois (Klar et al., 2014) et récemment deux nouveaux patients américains (Abdulhay et al., 2019). Ces familles possèdent des mutations soit de l'ATG - le codon d'initiation de la traduction – soit du site donneur d'épissage de l'exon 2 induisant un défaut de l'épissage alternatif du gène, entraînant un saut de l'exon 2 et une disparition du domaine transactivateur de la protéine GATA-1. De ces 2 types de mutations résulte la production de la forme courte de la protéine GATA-1 (GATA-1s) et une absence de la forme longue de GATA-1 (GATA-1L). Cependant, aucune mutation n'a été retrouvée dans les registres français, allemands, anglais soient près de 1 000 patients. La mutation avait été précédemment d'écrite par Hollanda et al. (Hollanda et al., 2006) avec des anomalies myélodysplasiques d'allure congénitale, des signes de dysmégacaryopoïèse et de dysérythropoïèse.

Une autre étude a montré une diminution de la traduction de l'ARNm de GATA-1 dans des cellules érythroïdes primaires issues de patients présentant une haplo-insuffisance en une RP connue pour être mutée dans l'ABD ce qui ferait de la diminution de la traduction de GATA-1 un processus commun à toutes les haplo-insuffisances en un gène RP (Ludwig et al., 2014). Une étude récente de 2017 a montré via des cultures *ex vivo* une diminution de la prolifération de cellules progénitrices $CD34^+$ issues de sang périphérique de patient atteints d'ABD possédant une mutation du gène *GATA-1* accompagné d'un retard dans la différenciation érythroïde. A l'inverse, une augmentation du marqueur $CD41^+$ a été observée mettant en évidence une perturbation du profil de différenciation entre les mégacaryocytes et les cellules érythroïdes. Ces données démontrent que la dysrégulation de la traduction de GATA-1 est une caractéristique commune des mutations en un gène RP ou de GATA-1 dans l'ABD (O'Brien et al., 2017) (figure 21).

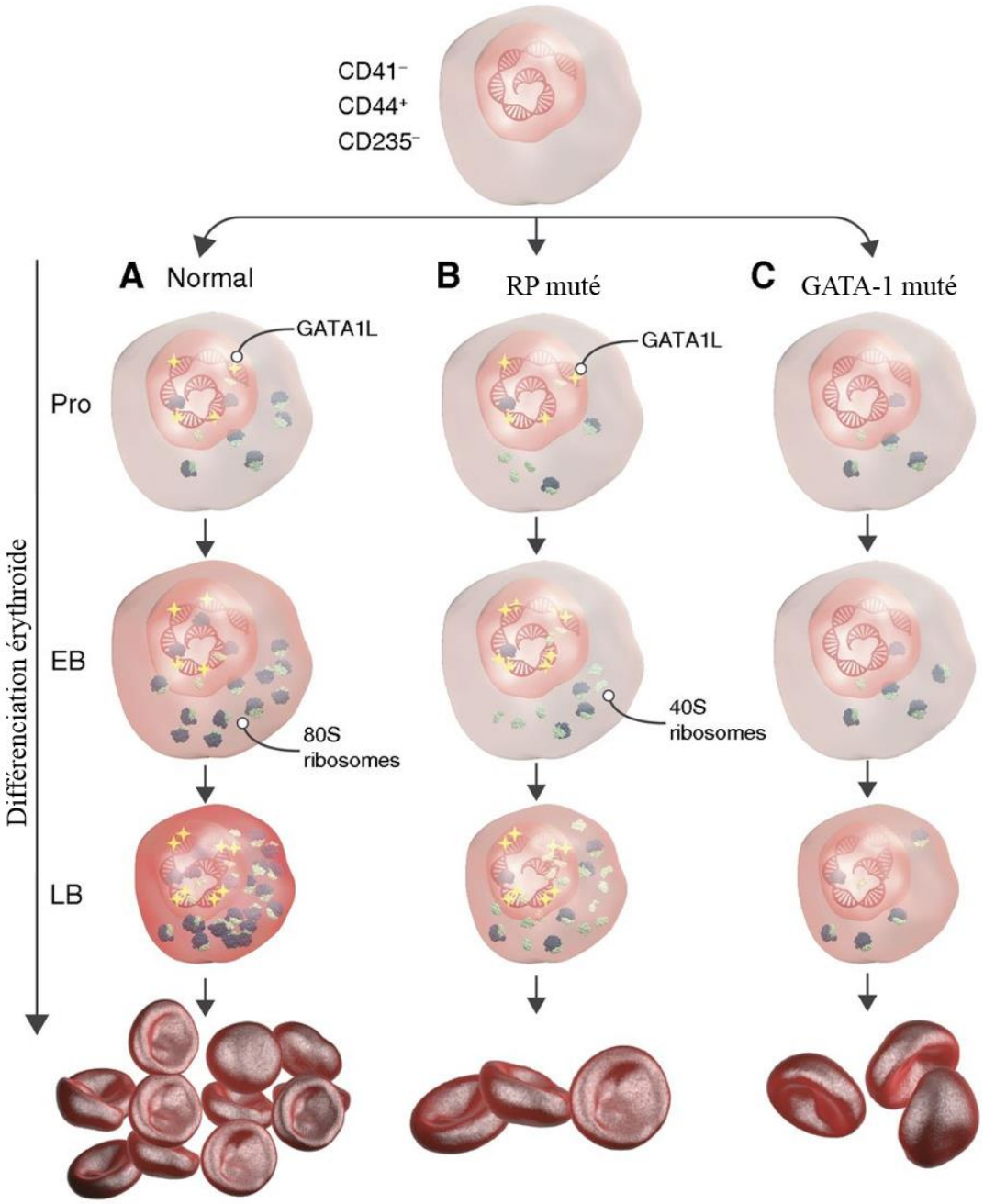


Figure 21 : Schéma descriptif du rôle des mutations RP et GATA-1 au cours de l'érythropoïèse dans l'ABD. (A) En condition normale, GATA-1L induit les gènes favorisant la traduction et la synthèse de l'hème et la production adéquate des érythrocytes. (B) Lors de mutations RP, GATA-1L induit les gènes responsables de la traduction et synthèse de l'hème mais un assemblage défectueux du ribosome entraîne une érythropoïèse aberrante et une anémie. (C) GATA-1 muté entraîne une diminution de l'expression des gènes codant pour la traduction et la synthèse de l'hème malgré un assemblage normal des ribosomes menant à une anémie (O'Brien et al., 2017).

2. Le gène *TSR2*

Le gène *TSR2* (Ribosome maturation factor) code pour une protéine TSR2 contenant un motif WGG, constituée de 191 acides aminés et de 21kDa. Celle-ci est retrouvée conservée au cours de l'évolution chez différentes espèces. La structure de cette protéine est composée de six hélices α très serrées et d'une petite feuille β antiparallèle. En 2014, une étude a permis d'identifier des mutations dans ce gène (Gripp et al., 2014). La protéine TSR2 peut interagir avec la protéine RPS26 et intervient dans le processus des pré-ARNr ainsi que dans la biogenèse des ribosomes (figure 22).

Une récente étude a permis de montrer que le mutant TRS2 (p.E64G) identifié dans l'anémie de Blackfan-Diamond présente une liaison à la protéine RPS26 plus faible que la forme sauvage. De plus, le mutant TSR2 exprimé dans la levure induit une altération de sa croissance, restaurée par la suite après une surexpression de RPS26. Une accumulation dans le cytoplasme du pré-ARN 20S immature a également été observée. Enfin, l'équipe a identifié des segments spécifiques à l'eucaryotes (ESS) au sein de la protéine RPS26 servant de balise afin d'attirer la protéine TSR2. La protéine RPS26 nouvellement synthétisée va être transportée du cytoplasme au noyau via un complexe qu'elle forme avec des importines. Une fois dans le noyau, la protéine TSR2 dissocie ce complexe par le biais des ESSs et va séquestrer la protéine RPS26 en lui permettant un transfert en toute sécurité vers le pré-ribosome 90S (Schütz et al., 2018). Tous ces éléments permettent d'une part de mieux appréhender le rôle de la protéine TSR2 dans le processus de traduction ainsi que dans l'hématopoïèse humaine, d'autre part d'assimiler le rôle de la mutation dans la maladie.

3. Le gène EPO

Dans la finalité de diagnostiquer la cause génétique inconnue et responsable de la maladie chez différents patients atteint de ABD, une équipe a réalisé des séquençages d'exomes complets et a identifié une nouvelle mutation faux-sens localisée sur le gène *EPO* codant l'érythropoïétine (chr7 : 100320704 G> A , R150Q) (Kim et al., 2017). Il s'agit d'une mutation homozygote récessive. La mutation a un impact faible sur l'affinité globale de la liaison avec son récepteur mais considérable sur la cinétique de l'interaction entre la protéine EPO et son récepteur EPOR. Il semble que cet effet puisse avoir d'importantes conséquences sur la signalisation en aval. Cette mutation entraîne une diminution de l'efficacité de la protéine sur

la différenciation et la prolifération cellulaire, une altération de la maturation. De plus, l'ensemble des cibles de la protéine – notamment STAT1 et STAT3 - montre une activation modifiée du fait d'une phosphorylation réduite. L'altération de l'érythropoïèse et la sélectivité fonctionnelle de la protéine EPO mutée sont dues à une activation altérée de JAK2. Le mutant EPO (R150Q) possède une moindre capacité à favoriser la dimérisation de son récepteur – essentielle à une activation complète des différentes cibles - entraînant une réduction de l'activation de la protéine JAK2.

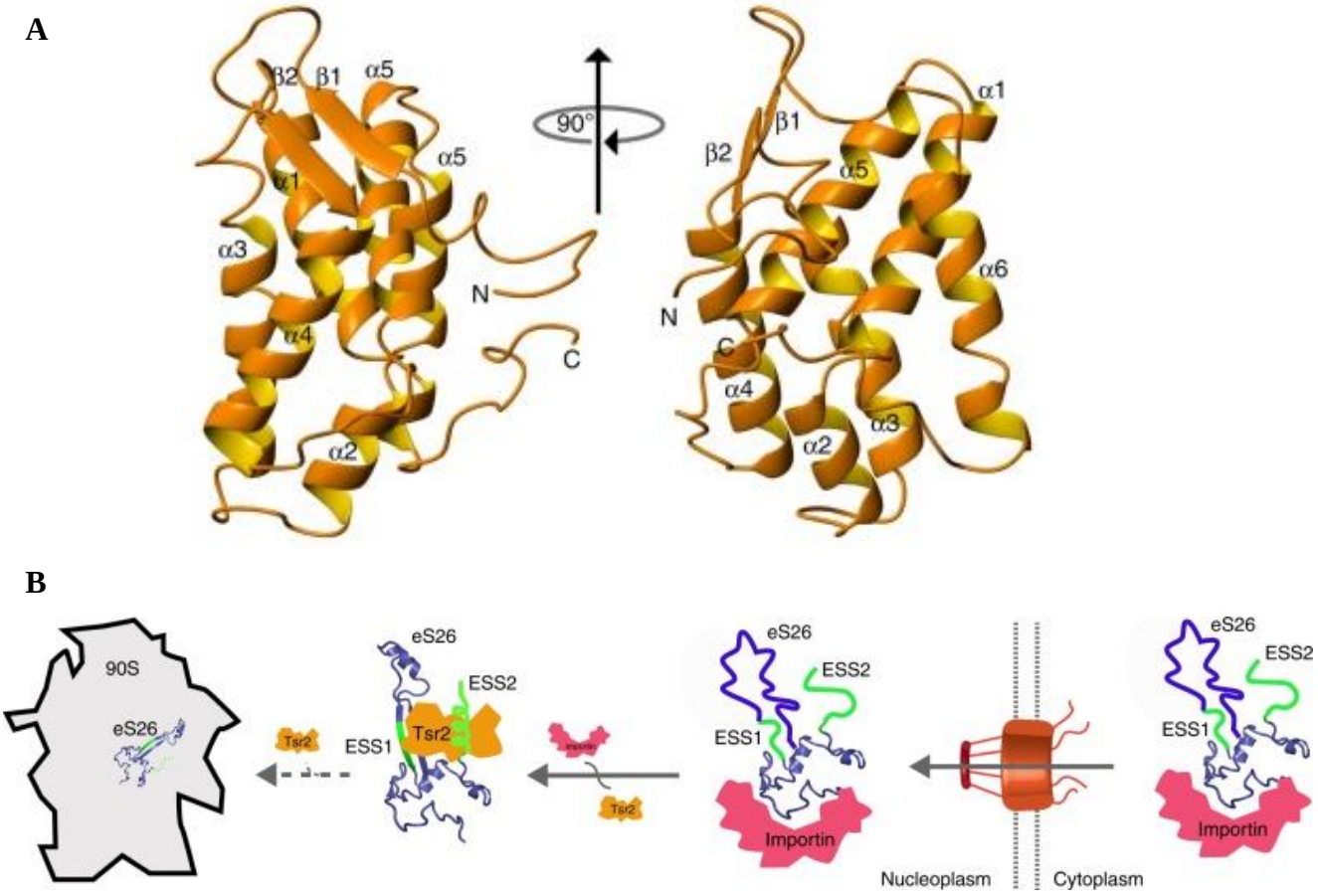


Figure 22 : Structure et rôle de la protéine TSR2. A) Représentation de la structure de TSR2 composée d'hélices α et β. (B) Modèle du transport de RPS26 (eS26) vers le pré-ribosome 90S. La protéine RPS néosynthétisée est transportée du cytoplasme au noyau par les importines. Une fois dans le noyau, TSR2 dissocie RPS26 des importines de manière RanGTP indépendante par le biais de segments spécifiques eucaryotes (ESS) localisés au niveau de RPS26. TSR2 séquestre RPS26 ce qui permet son transfert vers le pré-ribosome 90S (Schütz et al.,2018).

IV. Les mécanismes physiopathologiques de l'Anémie de Blackfan-Diamond

A. Modèles animaux dans l'étude de l'ABD

Différents modèles animaux ont été utilisés pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie.

1. La drosophile

La *Drosophila Melanogaster*, couramment appelé Drosophile, est un modèle intéressant quoique limité dans l'étude de la physiopathologie de la maladie. Il illustre la variation du phénotype dans l'ABD en lien avec l'haplo-insuffisance en protéine ribosomique qui mène au « syndrome minute » illustrée par des anomalies du développement et de la croissance, une infertilité, des anomalies des ailes, de petits yeux et une mortalité accrue lors de la dernière étape embryonnaire ou à la première étape larvaire (Kongsuwan et al., 1985; Lambertsson, 1998; Marygold, Coelho, & Leevers, 2005). Tout comme chez l'Homme, l'homozygotie d'une mutation d'un gène RP chez la Drosophile est létale. Le « syndrome minute » n'existe pas spontanément pour le gène *rps19*. L'insertion d'un élément P dans la région promotrice du gène permet de reproduire ce syndrome (Fixler and Mohandas, communication). L'importance des anomalies est inversement corrélée avec le niveau d'ARNm de rps19. Plus ce dernier est bas plus les anomalies sont prononcées étayant le mécanisme d'haplo-insuffisance comme mécanisme principal impliqué au cours de l'ABD. Récemment, le modèle de drosophile a été utilisé pour l'étude de la protéine p53 à la suite de mutations dans les gènes codant pour une protéine ribosomique. Ces études montrent que les cellules de drosophile portant des mutations dans les gènes RP, qui sont éliminées par compétition cellulaire avec des cellules de type sauvage, activent un gène cible de p53, *Xrp1*. Dans l'ABD, les mutants RP humains activent la p53 elle-même, via une voie de stress nucléolaire. Ces résultats suggèrent un lien entre les mutants des RP de mammifères et de drosophile, la traduction et la compétition cellulaire (Danilova, Sakamoto, & Lin, 2008; Uechi et al., 2008) (Baker, Kiparaki, & Khan, 2019).

2. Le poisson zèbre (figure 23 a-b)

Chez le poisson zèbre, dans un modèle morpholino l'inhibition du gène codant pour la protéine rps19 induit une petite taille, un retard de différenciation des progéniteurs, une diminution du nombre de globules rouges ainsi que de la concentration d'hémoglobine (Danilova et al., 2008; Uechi et al., 2008). Des études ont été également réalisées pour la protéine rpl11 dont l'inhibition via un morpholino conduit à des anomalies du système nerveux ainsi qu'un défaut de développement des cellules souches hématopoïétiques. L'invalidation de rpl11 est létale vers le sixième jour post-fertilisation (Danilova, Sakamoto, & Lin, 2011). L'étude des protéines mutées hétérozygotes de rps8, rpl35, rpl36a chez le poisson zèbre montrent une fréquence importante de tumeurs malignes des gaines des nerfs périphériques (Amsterdam et al., 2004). Enfin, l'inhibition du gène *rps7* dans ce modèle de poisson zèbre induit les mêmes défauts morphologiques que ceux décrits chez les patients (petite taille, malformation du cœur et de la tête) accompagnés d'une altération de la différenciation érythroïde induisant à une anémie. Cela est dû à la fois à une diminution de l'expression transcriptionnelle de GATA-1 et de la globine α et à une activation de la voie p53 avec une augmentation de l'expression transcriptionnelle de p53, son régulateur MDM2, et de ces cibles Bax et Puma (Duan et al., 2011). Une inhibition de la protéine p53 et le rétablissement de la protéine rps7 abolissent les anomalies morphologiques et le défaut de l'érythropoïèse.

3. Le modèle murin (figure 23c)

Bien que le modèle murin permette une meilleure compréhension physiopathologique d'une maladie, il est impossible d'associer les résultats obtenus chez la souris directement à l'Homme. Il existe de grandes différences entre les érythropoïèses humaine et murine aussi bien du point de vue génétique que fonctionnel. Malgré ces faits, plusieurs modèles murins ont été développés afin de comprendre la physiopathologie de la maladie.

Les souris Dark skin Dsk3$^{+/-}$ porteuses d'une mutation *Rps*19 ou les souris Dsk4$^{+/-}$ possédant une mutation *Rps*20 présentent un retard de croissance, un trouble pigmentaire, un défaut de l'érythropoïèse accompagné d'une anémie modérée et une augmentation de l'apoptose suite à la stabilisation de la protéine p53 (McGowan et al., 2008). Une collaboration avec l'équipe de David Bodine (NIH, Bethesda, USA) a permis la génération d'un modèle de souris portant la mutation la plus récurrente dans l'ABD chez l'Homme au niveau du gène

*RPS*19 (p.Arg62Trp). L'expression conditionnelle du transgène Cre/Lox *rps*19 $^{+/Mut}$ mène à un retard de croissance et à un défaut de l'érythropoïèse avec une diminution du nombre de BFU-e et de CFU-e (Devlin, DaCosta, Mohandas, Elliott, & Bodine, 2010). Une invalidation homozygote du gène *Rps19* entraîne une létalité *in utero* (Matsson et al., 2004). L'équipe de Colin Sieff a étudié l'inhibition de rps19 via un ARN interférant. Suite à des cultures primaires de cellules érythroïdes issues du foie fœtal de ces souris, l'inhibition de la protéine c-MYB et la stabilisation de p53 ont été observées ainsi qu'une diminution de l'expression transcriptionnelle et protéique du récepteur c-kit. Les cellules érythroïdes ne présentent pas de retard de différenciation bien que la prolifération soit réduite (Sieff et al., 2010). D'autres haplo-insuffisances ont été étudiées chez la souris telle que le gène *rpl*11 (Morgado-Palacin et al., 2015). Alors que l'homozygotie entraîne une mortalité, les souris *rpl*11$^{+/-}$ développe une anémie avec un nombre réduit de BFU-e et un retard de différenciation des précurseurs accompagné d'une stabilisation de la p53 et de l'activation transcriptionnelle du proto-oncogène *c-MYC*.

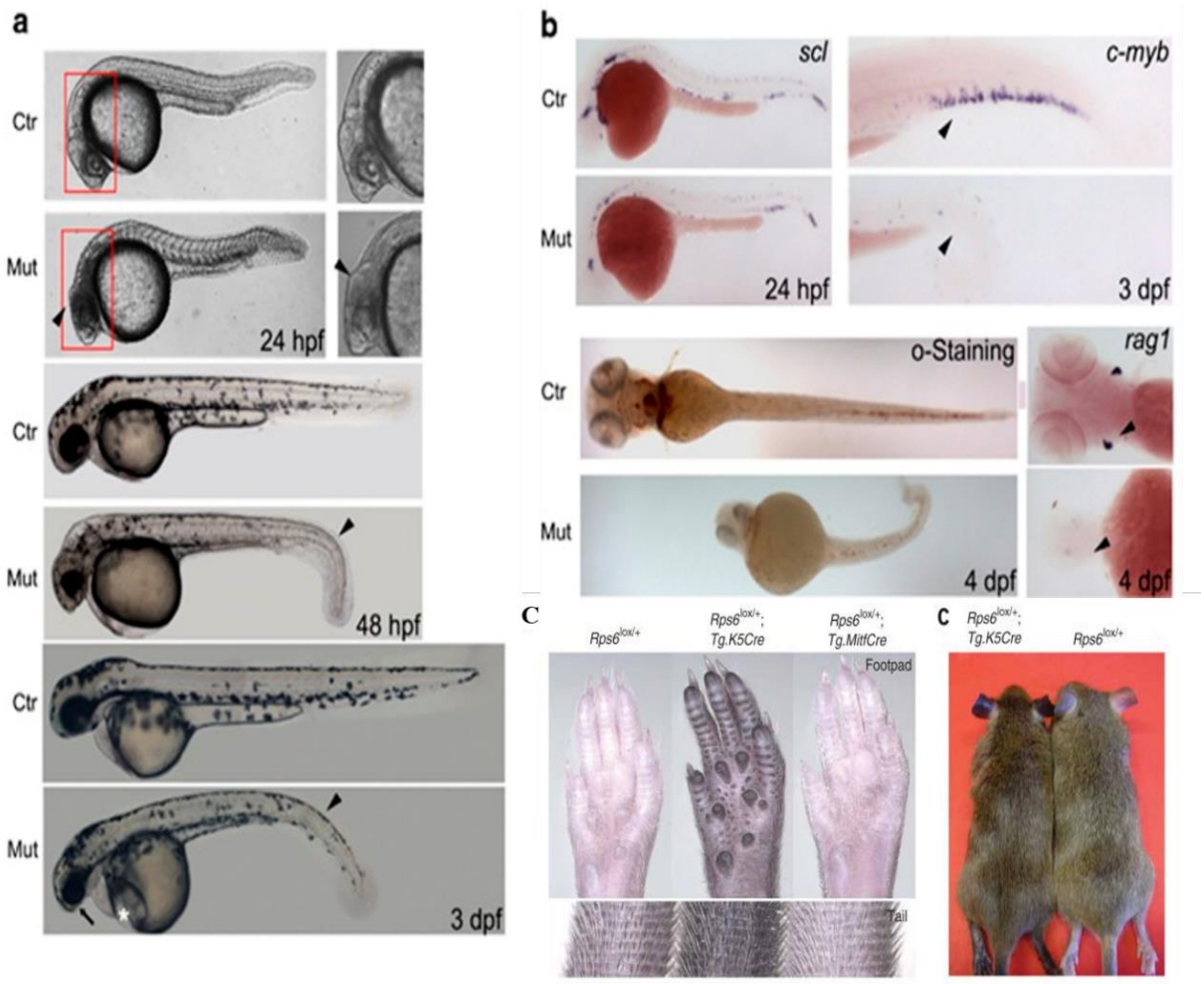


Figure 23: Illustrations de modèles animaux dans l'anémie de Blackfan-Diamond. (A) Embryons de poissons zèbres à différents stades montrant le phénotype mutant homozygotes de rps19. 24h après la fécondation (hpf), la limite entre le cerveau moyen et postérieur est mal développée chez les mutants. Une queue courbée est également observée chez les embryons mutant (flèche noir) (Chakraborty et al., 2009). (B) Analyses des défauts hématopoïétiques chez des embryons mutants homozygotes rps19. Les CSHs n'étaient pas affectées ou légèrement moins dans les embryons mutants à 24 hpf. L'expression de c-myb dans les CSHs à 3 jours après fécondation (dpf) et l'hémoglobine colorée 4 dpf ont presque disparu dans les embryons mutants (Duan et al., 2011). (C) Souris Dsk3/+ et Dsk4/+ étant $Rps6^{lox/+}$ présentant un trouble pigmentaire au niveau des pattes, des oreilles et de l'épiderme et du derme de la queue (McGowan et al., 2008).

B. L'anémie de Blackfan-Diamond, une maladie du ribosome

1. Biogenèse normale du ribosome

Les ribosomes produisent toutes les protéines cellulaires au cours d'un processus biologique complexe hautement régulé appelé traduction (figure 24). C'est une machinerie fondamentale pour la fonction cellulaire de synthèse protéique dont le processus est conservé au cours de l'évolution. Dans une cellule en croissance, l'assemblage du ribosome est le processus le plus consommateur d'énergie (Wanner, 1999). Chez les eucaryotes, le ribosome est une particule complexe constituée de deux sous-unités distinctes – une petite sous-unité 40S et une grande sous-unité 60S - contenant 80 protéines ribosomiques et 4 ARN ribosomiques (ARNr). L'assemblage du ribosome est un processus complexe se déroulant séquentiellement au sein du nucléole. Le ribosome transite ensuite grâce à des facteurs nucléolaires vers le cytoplasme où a lieu la traduction des ARNm en protéines (Hernandez-Verdun et al., 2010). L'assemblage du ribosome dépend de l'action coordonnée de plus de 200 facteurs d'assemblage des ribosomes, de trois ARN polymérases qui assurent la transcription des quatre ARNr non codants et de l'ensemble des protéines ribosomiques, de plus de 150 petits snoARN (small nucleolar ARN) et des produits des gènes spécifiques de chaque RP. Tout au long de sa biogenèse, les facteurs d'assemblage s'associent de manière séquentielle et transitoire aux intermédiaires pré-ribosomiques depuis leur origine dans le nucléole jusqu'à leur destination cytoplasmique finale (Klinge & Woolford, 2019). Le ribosome est constitué de 47 protéines et de trois ARNr (5S, 5.8S et 28S) appartenant à la grande sous-unité 60S et de 33 protéines et d'un seul ARNr (18S) appartenant à la petite sous-unité 40S (Klinge et al., 2012; Yusupova & Yusupov, 2014). Les ARNr 18S, 5.8S et 28S sont formés à partir d'un long transcrit commun (le pré-ARNr 47S) dont la transcription est initiée dans le nucléole par l'ARN pol I, après plusieurs étapes de clivage de l'ARNr générant de nombreux ARN intermédiaires (pré-ARNs) (A. K. Henras et al., 2008). Ils sont produits à partir de zones d'ADN répétées (ADNr) localisées sur les bras courts des divers chromosomes (13, 14, 15, 21 et 22) (Henderson, Warburton, & Atwood, 1972). Le pré-ARN néosynthétisé s'associe à des RP, des snoRNP et d'autres protéines non ribosomiques formant ainsi la particule 90S. Cette dernière sera par la suite scindée en deux particules pré-ribosomiques : le pré-40S et le pré-60S. Les deux particules pré-ribosomiques possèdent chacune une voie de maturation distincte permettant l'obtention des sous unités ribosomiques 40S et 60S matures. Des études récentes ont permis d'expliquer le recrutement dans le temps des divers facteurs d'assemblage dans les pré-ARNr des ribosomes.

Un important nombre de ces facteurs se lient à la région ETS en 5' démontrant un rôle central de cette séquence pré-ARNr (Chaker-Margot, Hunziker, Barandun, Dill, & Klinge, 2015; Liman Zhang, Wu, Cai, Chen, & Ye, 2016). Le domaine 5' est chaperonné par le snoARN U14 et des facteurs d'assemblage tels que Dbp4 et Efg1 (Choque et al., 2018; Shu & Ye, 2018; Soltanieh, Lapensée, & Dragon, 2014; Soltanieh et al., 2015). Le domaine central est quant à lui lié au snR30 et à des facteurs d'assemblage comme Rok1, Utp23 ou Rrp5 (Lebaron et al., 2013; J. Lu, Sun, & Ye, 2013; Morrissey & Tollervey, 1993; Wells et al., 2017). La biogenèse du ribosome et la traduction des protéines sont étroitement coordonnées dans le temps et l'espace (O'Donohue et al., 2010). Ce processus se divise en cinq parties principales : i) la synthèse de l'ARN pré-ribosomique (pré-ARN) et des protéines ribosomiques, ii) modification

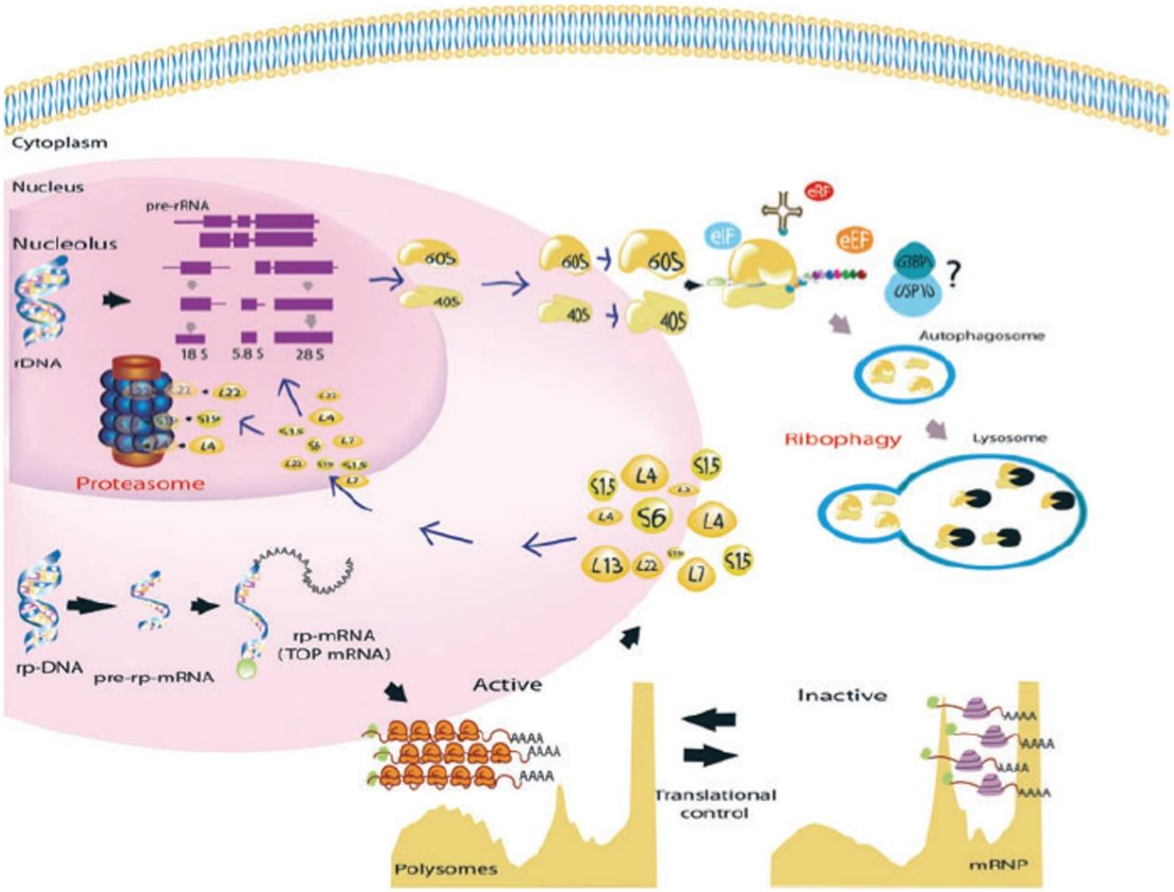


Figure 24 : Synthèse et turnover des ribosomes au sein de la cellule. Synthétisées dans le cytoplasme puis importées dans le nucléole, les RP sont soit assemblées au sein de l'une des sous-unités du ribosome (40S ou 60S) en formation avec les ARNr soit dégradées par le protéasome. Les pré-particules des sous-unités du ribosome sont exportées dans le cytoplasme pour former les ribosomes matures et fonctionnels permettant la synthèse de toutes les protéines. Après utilisation, les ribosomes seront dégradés par ribophagie (Caldarola et al., 2009).

du pré-ARN, iii) repliement de l'ARN ribosomal (ARNr), iv) assemblage du pré-ARN avec les RP, v) traitement endo et exonucléotique du pré-ARN (Sloan et al., 2013).

2. La synthèse des protéines

a. Les ARN ribosomiques

L'ARN 5S est transcrit par l'ARN polymérase III dans le nucléoplasme (Fedoriw, Starmer, Yee, & Magnuson, 2012; K. Henras et al., 2015) puis migre dans le nucléole où il finalisera sa maturation avant d'être incorporé au sein de la sous-unité pré-60S. Les ARNs 5,8S, 18S et 28S proviennent de la maturation de l'ARN précurseur pré-ARN 47S lui-même synthétisé par l'ARN polymérase Pol I dans le nucléole (Anthony K. Henras et al., 2015). Ce précurseur pré-ARN 47S associé à l'ARNr 5S et aux différentes protéines ribosomiques forme la structure ribonucléoprotéique pré-ARN 90 S. Cette structure subit différentes modifications éliminant des séquences transcrites ETS (external transcribed spacer) en 5' puis en 3' du précurseur et les deux séquences ITS (internal transcribed spacer) ITS1 et ITS2. Les espaces transcrits contiennent plusieurs sites de clivages ciblés par des endonucléases. Les snoARN forment les snoRNP (snoRiboNucléoProtéines) qui sont responsables de plusieurs étapes de clivage subis par le pré-ARN 90S. Chaque modification est effectuée par un snoRNP particulier (K. Henras et al., 2017). Le pré-ARN sera ensuite scindé en deux au niveau de l'ITS1 pour aboutir à la formation des particules pré-40S et pré-60S. Toutes les modifications ont lieu de manière concomitante avec le repliement du pré-ARN et son assemblage avec les protéines ribosomiques. Les deux pré-particules formées suivent des voies de maturation indépendantes aboutissant d'une part à la formation de l'ARNr 18S à partir du clivage de l'extrémité 3' du pré-ARN 40S et d'autre part la formation des ARNr 5.8S et 18S suite au clivage de l'ITS2 de l'ARN pré-60 S (Rouquette et al., 2005). Une étude récente a montré l'existence d'un nouveau modèle de maturation de la petite sous-unité du ribosome (SSU pour small ribosomal subunit) avec une indépendance fonctionnelle des domaines ETS en 5' et des ARNr au cours des premières étapes de l'assemblage des ribosomes. Cette indépendance permet une flexibilité de la maturation et semble donner une explication de l'importante efficacité de la synthèse des ribosomes. Cette étude met en évidence le rôle primordial du complexe UtpB, un composant de l'ETS en 5' de la ribonucléoprotéine (RNP)(Hunziker et al., 2019). Le complexe UtpB composé de six sous-unités (figure 25) est un chaperon essentiel des ARN pour initier l'assemblage des ribosomes (Hunziker et al., 2016). Les sites de liaison désactivés au sein d'UtpB inhibe

l'association prématurée de facteurs d'assemblage tels que Mpp10, Sas10 et Utp11. Une fois la transcription de la 18S finalisée et la maturation complète de tous les domaines de l'ARNr achevée, la conformation du complexe UtpB est modifiée afin de permettre la formation de la SSU (Hunziker et al., 2019)(figure 26).

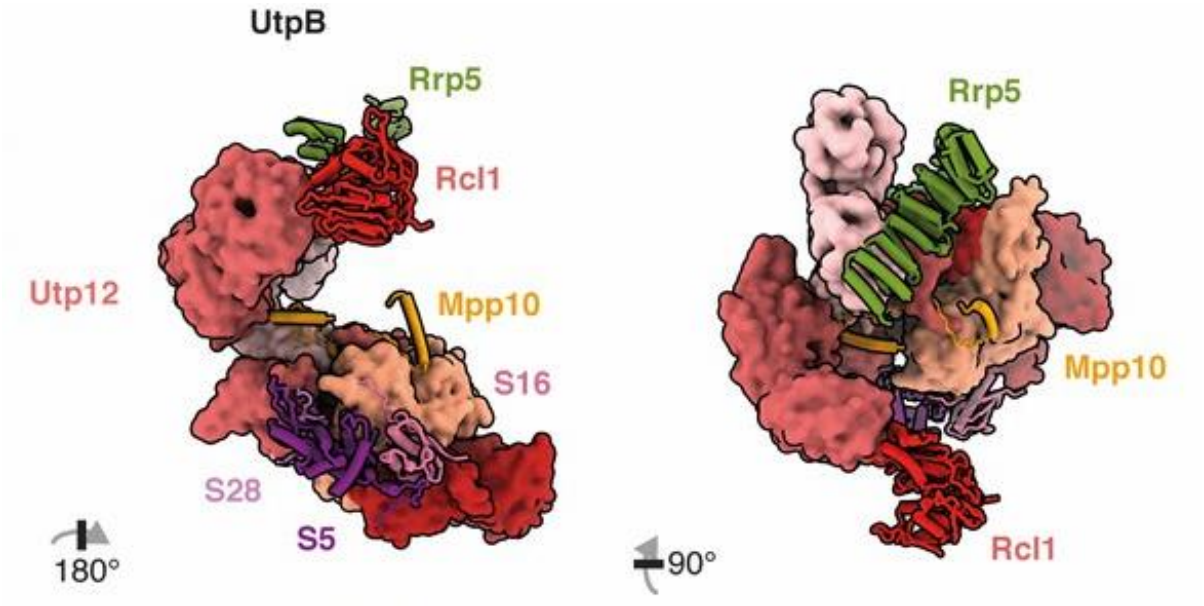


Figure 25 : Conformation du complexe UtpB (Hunziker et al., 2019).

A ce jour les étapes initiales de l'assemblage de la 60S sont incomprises. Certaines hypothèses tendent vers une maturation précoce de l'ARNr associée à son repliement au sein des particules 60S en maturation. L'incorporation de la 5S RNP à la particule pré-60S reste inconnue mais elle se produit dans une conformation « tordue » de la 5S RNP. L'ITS2 serait éliminé très tardivement. Les particules pré-60S possèdent environ 30 facteurs d'assemblage et 30 RP dont la plupart semble être primordiale pour la stabilisation structurelle de la particule ribosomique (Baßler & Hurt, 2019).

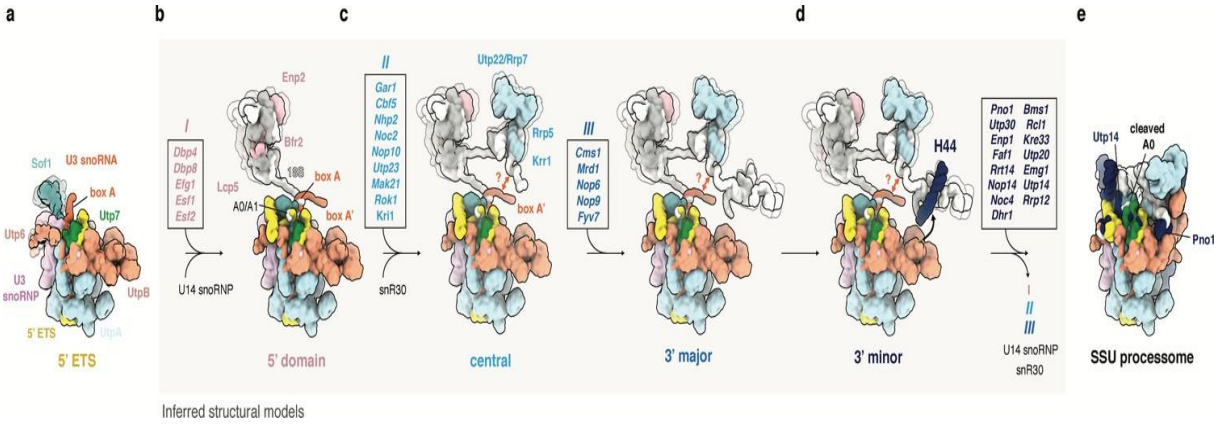


Figure 26 : Modèle du processus de formation de la petite sous-unité du ribosome (SSU). (a) La séquence ETS en 5' recrute le complexe UtpB (rouge clair), le snoRNP U3 et d'autres facteurs. UtpB adopte une conformation rétractée. (b-d) L'ETS 5' du RNP forme un module distinct lors de la transcription et de la maturation des domaines de l'ARNr 18S. Chaque domaine de l'ARNr 18S (central, major et minor) peut indépendamment recruter des facteurs d'assemblage. Les facteurs d'assemblage associés de manière transitoire à une étape d'assemblage particulière sont encadrés et étiquetés (I, II, III). Ces facteurs ainsi que U14, snR30 quittent la particule en cours de maturation avant la formation de SSU (flèche en d). (d) UtpB agit en tant que capteur pour l'extrémité 3' de l'ARNr 18S en reconnaissant les éléments du domaine mineur. Un changement conformationnel de UtpB et le recrutement de 3 facteurs mineurs conduit à la formation de SSU (Hunziker et al., 2019).

b. Les protéines ribosomiques

Synthétisées dans le cytoplasme, les protéines ribosomiques sont des constituants primaires des ribosomes nécessaires à la bonne synthèse des différentes sous-unités. Une mutation ou l'absence de l'une de ces protéines altère le processus de synthèse protéique (Choesmel et al., 2007, 2008; Doherty et al., 2010; Farrar et al., 2008; Léger-Silvestre et al., 2005). Les RP sont ensuite transportées via les pores nucléaires dans le noyau grâce à de nombreuses protéines telles que les importines β, β3 et 11, les protéines RanB5, RanB7 et la transportine et à leurs séquences NLS (Nuclear Localization Signal) (D. Görlich, 1997; Gorlich, 1998; M. Görlich, 1996). Puis, elles sont transportées dans le nucléole et participent à

l'assemblage du pré-ribosome. La protéine nucléolaire nucléoline semble participer à l'import des RP dans le nucléole (Bouvet et al., 1998). Le transport nucléocytoplasmique est lié au RanGTP. Après translocation via les pores nucléaires, les protéines RanGAP et RanBP1 hydrolysent l'exportine RanGTP lié à son cargo au cours du transport. Cette action permet la dissociation du cargo et l'exportine qui sera recyclée au noyau. Grâce au facteur NTF2 (nuclear transport factor 2), RanGDP retourne dans le noyau et participe à un nouvel export (Schilders, van Dijk, & Pruijn, 2007) (figure 27). Pour l'exportation nucléaire, une séquence d'export nucléaire (NES) est nécessaire. Pour la pré-particule pré-60S, la protéine adaptatrice Nmd3 est requise et permet le recrutement du récepteur d'exportation Crm1/Xpo1 (Gadal et al., 2001; Ho, Kallstrom, & Johnson, 2000; Thomas & Kutay, 2003; Trotta et al., 2003).

Le repliement et la maturation des pré-ARN sont contrôlés par les RP ainsi que par les interactions avec un grand nombre de facteurs d'assemblage du ribosome (ou RAF pour Ribosomal Assembly Factors). L'incorporation des RP est liée au repliement du pré-ARN (K. Henras et al., 2015) et au recrutement des RAF assurant des fonctions régulatrices et structurelles (Tafforeau et al., 2013; Woolford & Baserga, 2013). En effet, parmi les RAF se trouvent les nucléases éliminant les séquences ITS et ETS, les chaperons jouant un rôle dans le repliement de l'ARN ou encore des hélicases. Les RP agissent dans un ordre précis et sont requises pour l'assemblage structurelle, la maturation des pré-ARN et l'export nucléaire des particules pré-ribosomiques (R. Ferreira et al., 2005; Gamalinda et al., 2014; O'Donohue et al., 2010; Ohmayer et al., 2013; Pillet et al., 2015; Pöll et al., 2009; Robledo et al., 2008).

Il semble que les RP agissent telles des protéines chaperons en participant à un repliement correct des pré-ARN néosynthétisés. Il a été démontré que toutes les RP de la petite sous-unité du ribosome sont primordiales au bon déroulement de la maturation de cette sous-unité.

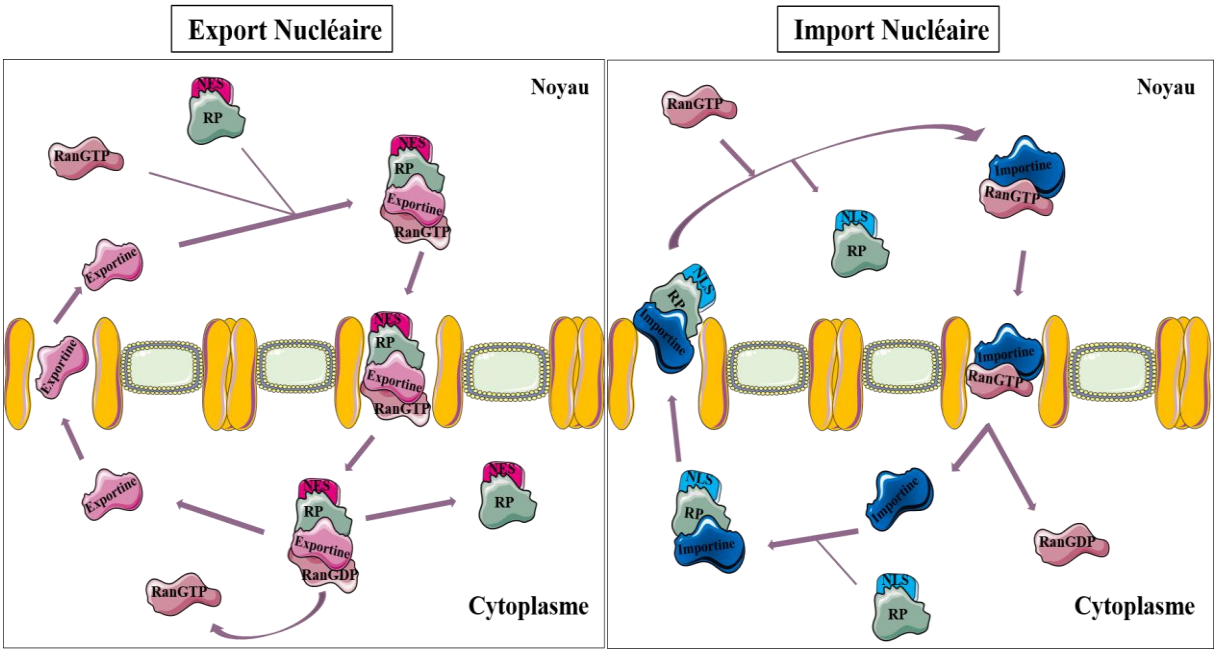


Figure 27 : Schéma du transport nucléocytoplasmique dépendant de Ran.

A gauche : Les ARNr-RP possédant la séquence nucléaire d'export NES associée aux exportines et RanGTP sont exportés du noyau. Après la translocation à travers le pore nucléaire, l'hydrolyse de RanGTP en RanGDP libère l'ARNr-RP-ranGDP-exportine dans le cytoplasme. L'exportine est recyclée dans le noyau. A droite : Les ARNr-RP contenant la séquence de localisation nucléaire (NLS) lient les importines dans le cytoplasme. L'association du RanGTP à l'importine dans le noyau libère l'ARNr-RP et permet l'export vers le cytoplasme du complexe RanGTP-importine (d'après Sloan et al., 2016).

L'étude réalisée par l'équipe du Pr. PE. Gleize a permis une classification des protéines ribosomiques de la petite sous-unité en deux groupes : les i-RPS (initiation-RPS) nécessaires dans les étapes initiales de la maturation et les p-RPS (progression-RPS) nécessaires à l'export des pré-ARN 40S du nucléole vers le cytoplasme et à leur maturation (Figure 28) (O'Donohue et al., 2010). Les deux groupes sont constitués de 16 RPs chacun :

- Pour les i-RPS : RPS3a, RPS4, RPS5, RPS6, RPS7, RPS8, RPS9, RPS11, RPS13, RPS14, RPS16, RPS15a, RPS23, RPS24, RPS27 et RPS28
- Pour les p-RPS : RPSA, RPS2, RPS3, RPS10, RPS12, RPS15, RPS17, RPS18, RPS19, RPS20, RPS21, RPS25, RPS26, RPS27a, RPS29, RPS30

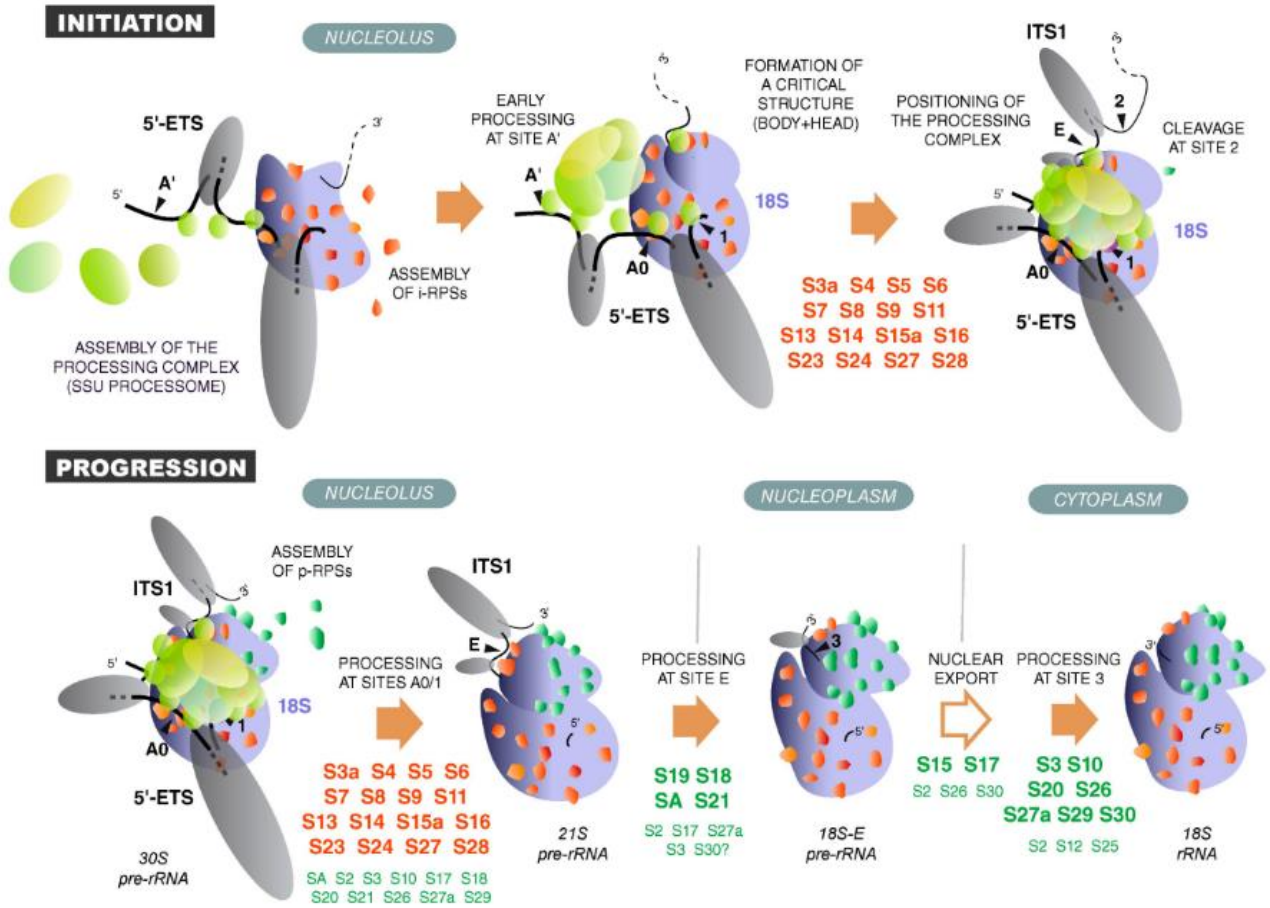


Figure 28 : Modèle d'activité de la protéine ribosomique dans la biogenèse du ribosome. Les protéines i-RPS (en orange) s'assemblent avec le pré-ARN naissant et des facteurs pré-ribosomiques précoces (violet) tels que les protéines UTP et les snoRNP U3 et U17. Les i-RPS participent au repliement du domaine ARNr 18S et à sa maturation au niveau des sites de clivage de l'extrémité 5' ETS et ITS1. Les protéines r-RPS (vert) sont impliquées dans les étapes de clivage de l'ITS au niveau des sites A0/1et dans les étapes en aval de la maturation de l'ARN 18S. Les particules pré-40S sont libérées dans le nucléoplasme après une étape de clivage au niveau du site E. Elles sont ensuite exportées vers le cytoplasme où les dernières étapes de la maturation ont lieu (O'Donohue et al., 2010).

c. Les différentes étapes de la synthèse protéique (figure 29)

Chez les eucaryotes, la synthèse protéique se déroule dans le cytoplasme au sein des ribosomes. Ce processus cellulaire peut se décomposer en trois grandes étapes : initiation, élongation et terminaison. Chacune des étapes est complexe, fait intervenir un grand nombre d'acteurs cellulaires et certains des mécanismes restent à ce jour inconnus. Les protéines ribosomiques ainsi que les ARNr, les ARNm, les ARNt, les facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison, les enzymes et les molécules pouvant apporter l'énergie comme l'ATP ou le GTP participent à la machinerie cellulaire. Chaque ribosome constitué de deux sous-unités (la 40S et la 60S) forme une structure de 80S qui s'assemble sur l'ARNm. La grande sous-unité va fixer les ARN de transfert (ARNt). Le ribosome possède trois sites :

- Le site A (ou aminoacyl) occupé par le complexe aminoacyl – ARNt qui fonctionne comme un accepteur du peptide en élongation. Il porte un acide aminé en attente de liaison avec la chaîne polypeptidique.
- Le site P (ou peptidyl) occupé par le complexe peptide – ARNt qui permet le transport de la chaîne de peptide en cours de synthèse liée à l'acide aminé porté par l'ARNt.
- Le site E (ou exit) occupé par l'ARNt partant du ribosome. Ce site permet la libération de l'ARNt désacétylé qui a livré l'acide aminé à la chaîne peptidique.

- Phase d'initiation (Jacksonet al., 2010) (figure 30)

Ce processus implique initialement l'identification appropriée du codon dans le site P : AUG codant pour une méthionine. eIF-2, le facteur d'initiation des eucaryotes, forme un complexe avec le GTP et l'ARNt d'initiation portant l'acide aminé méthionine, initiateur. Suite à la formation de ce complexe eIF-2-GTP-Met-ARNt, la petite sous unité 40S du ribosome va former une liaison avec ce dernier formant ainsi le complexe 43S. Les facteurs eIF1, eIF1A et eIF3 facilitent la liaison entre le complexe et le ribosome. Simultanément, le complexe eIF-4F modifie la conformation de l'ARNm grâce à son activité hélicase ARN-ATPase dépendante. Avec la participation coordonnée des facteurs eIF-4a dépendante de l'ATP, du facteur eIF3, des protéines liant l'ARN, eIF4B, eIF4 et de la protéine PABP (Poly(A) binding protein) liée à la queue poly(A) de l'extrémité 3' de l'ARNm, un réarrangement donnant naissance à une boucle liant les parties 5' et 3' de l'ARNm va se produire. Toutes ces modifications vont permettre l'assemblage du complexe 43S avec l'ARNm donnant ainsi le complexe 48S ou 43S-ARNm.

A la suite de quoi, le déchiffrage de l'ARNm lié au complexe 43S est initié dans le sens 5' - 3' afin de localiser le codon d'initiation AUG.

La séquence Kozak (GCCGCC(A/G)CCATGG) localisée en amont du codon d'initiation facilite la reconnaissance du codon AUG avec l'aide des facteurs eIF-1 et eIF-1A qui permettent au complexe de pré-initiation 43S d'atteindre ce codon. A la reconnaissance du codon d'initiation, il y a appariement de la séquence AUG de l'ARNm avec l'anticodon porté par le complexe eIF-2-GTP-Met-ARNt menant à un changement conformationnel du complexe 43S devenant ainsi le complexe d'initiation 48S. A la formation de ce complexe, le facteur eIF-1 se déplace et le GTP porté par le facteur eIF-2α est hydrolysé en GDP par le facteur eIF5. Cette hydrolyse induit la dissociation simultanée des facteurs eIF1, eIF3, eIF5 et le relagarge du complexe eIF-2-GDP de l'ARNt-Met au niveau du site P. Le complexe eIF5-B-GTP et la sous-unité 60S du ribosome s'associent au complexe 48S et donne le complexe d'initiation 80S. Cette étape est la dernière de la phase d'initiation et marque le début de la phase d'élongation.

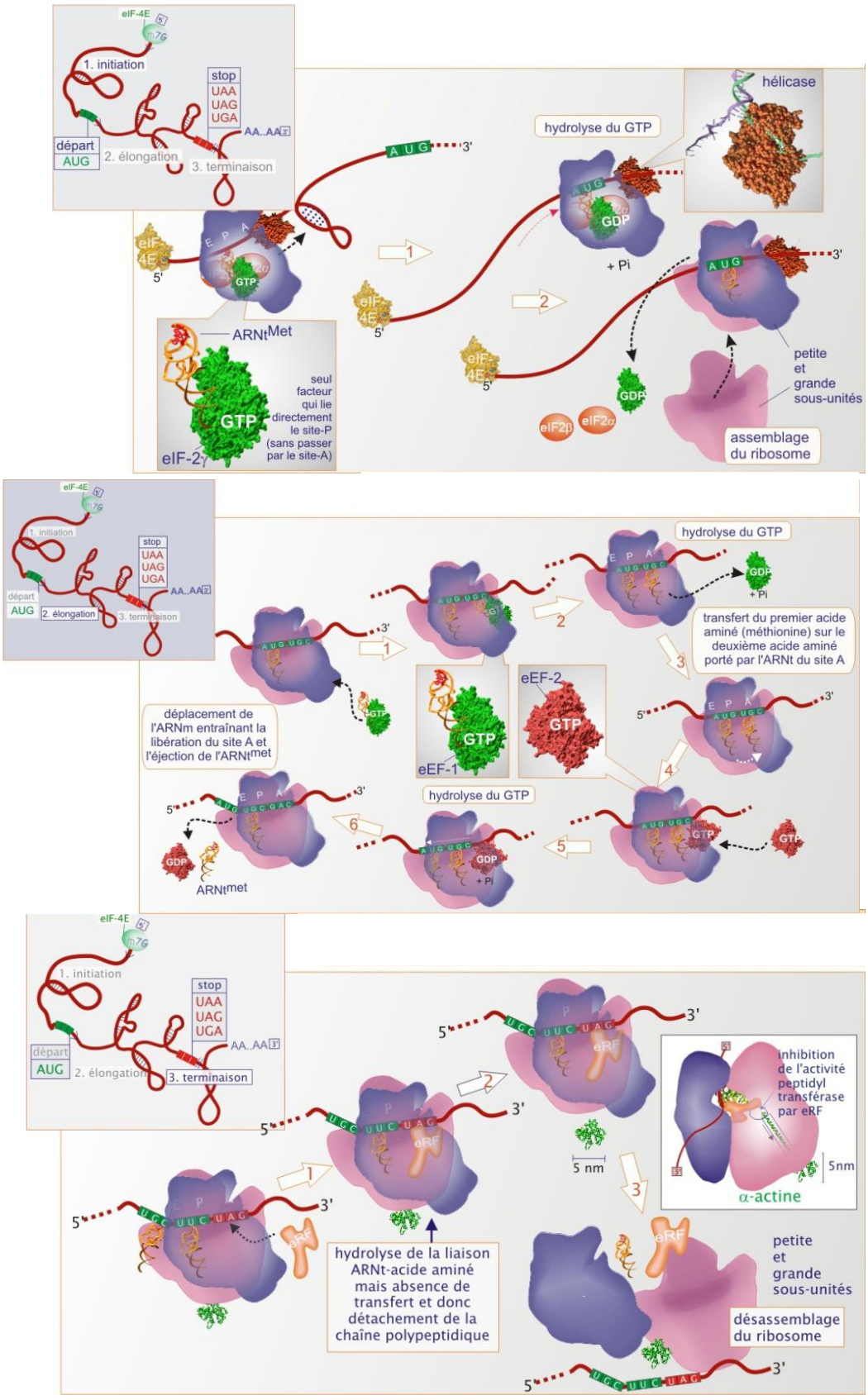


Figure 29 : Schéma représentatif des 3 principales étapes de la synthèse protéique (ressources Unisciel)

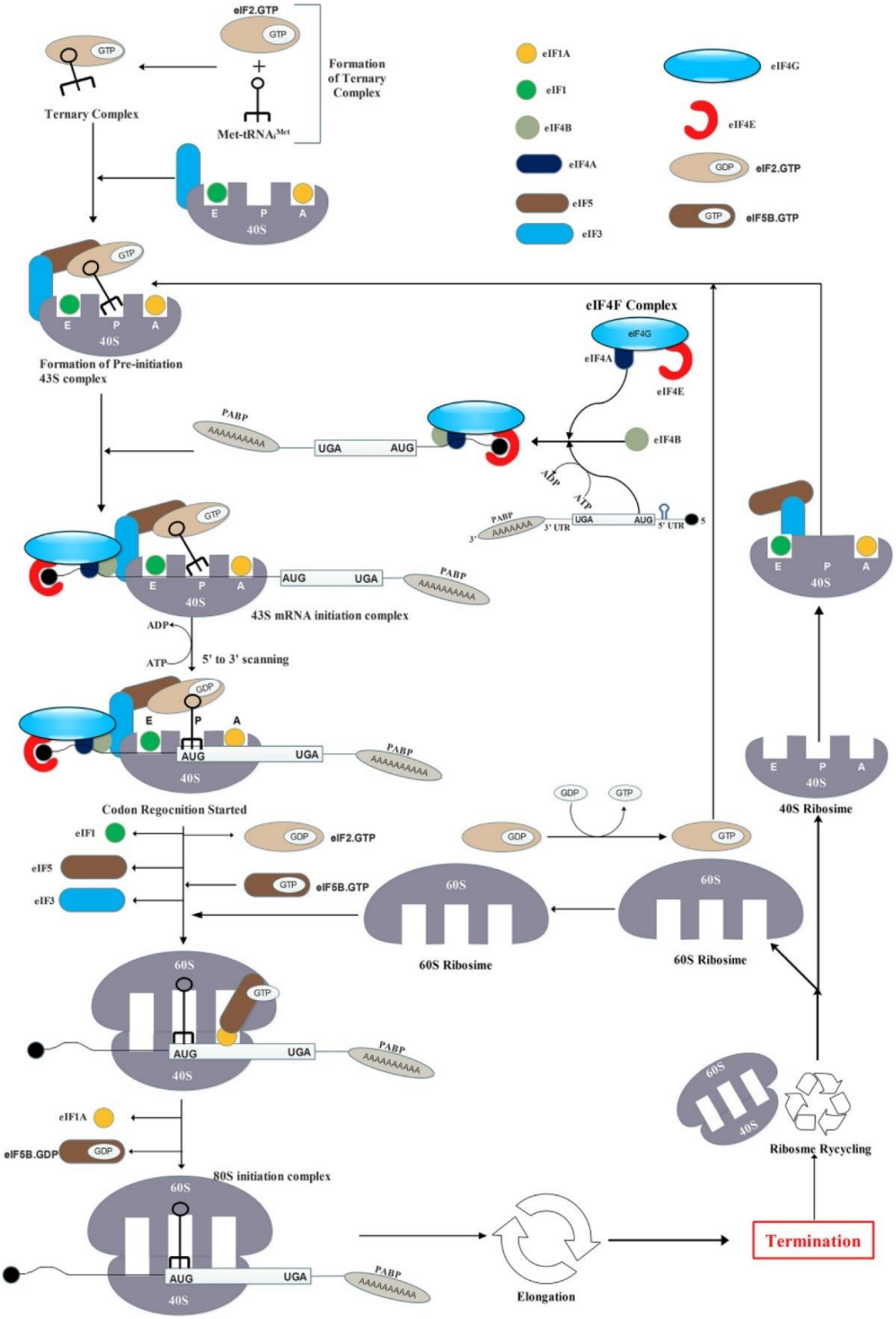


Figure 30 : Schématisation de la voie d'initiation de la traduction des eucaryotes. La traduction est un processus cyclique dans lequel la terminaison suit l'élongation et mène au recyclage générant des sous-unités ribosomiques séparées (Ali et al., 2017).

- Etape de l'élongation (figure 31)

Le peptide en formation se déplace le long du site A vers le site E sous la dépendance d'une peptidyl-transférase. Elle est elle-même dépendante du ribosome et du facteur d'élongation, EF2 associée au GTP contrôlant ainsi la translocation des ARNt sur le ribosome. La phase d'élongation est un cycle de trois phases : le décodage, la formation de la liaison peptidique et la translocation. La synthèse peptidique se réalise de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale de la chaîne peptidique. Au début de cette phase, le codon AUG est positionné sur le site P. eEF-1A, un facteur d'élongation, forme un complexe ternaire avec un GTP et l'aminoacyl-ARNt qui est chargé de l'acide aminé suivant. Ce dernier va être acheminé au site A du ribosome pour une traduction de l'ARNm. Le facteur eEF-1A assure un rôle protecteur contre l'hydrolyse pour les liaisons esters des acides aminés. Lors d'une reconnaissance correcte entre le codon et l'anticodon, un changement conformationnel du ribosome va permettre l'hydrolyse du GTP de eEF-1A qui sera relargué. Puis l'ARNt est décalé du site P vers le site E du ribosome alors que le peptidyl-ARNt est transloqué du site A au site P. Le facteur d'élongation EF2 associé au GTP facilite ce processus. Le site A se trouve à nouveau disponible pour interagir avec un nouveau complexe eEF-1A-GTP couplé à l'ARN-t chargé en un acide aminé. Ainsi un acide aminé est ajouté à chaque répétition de toute cette étape.

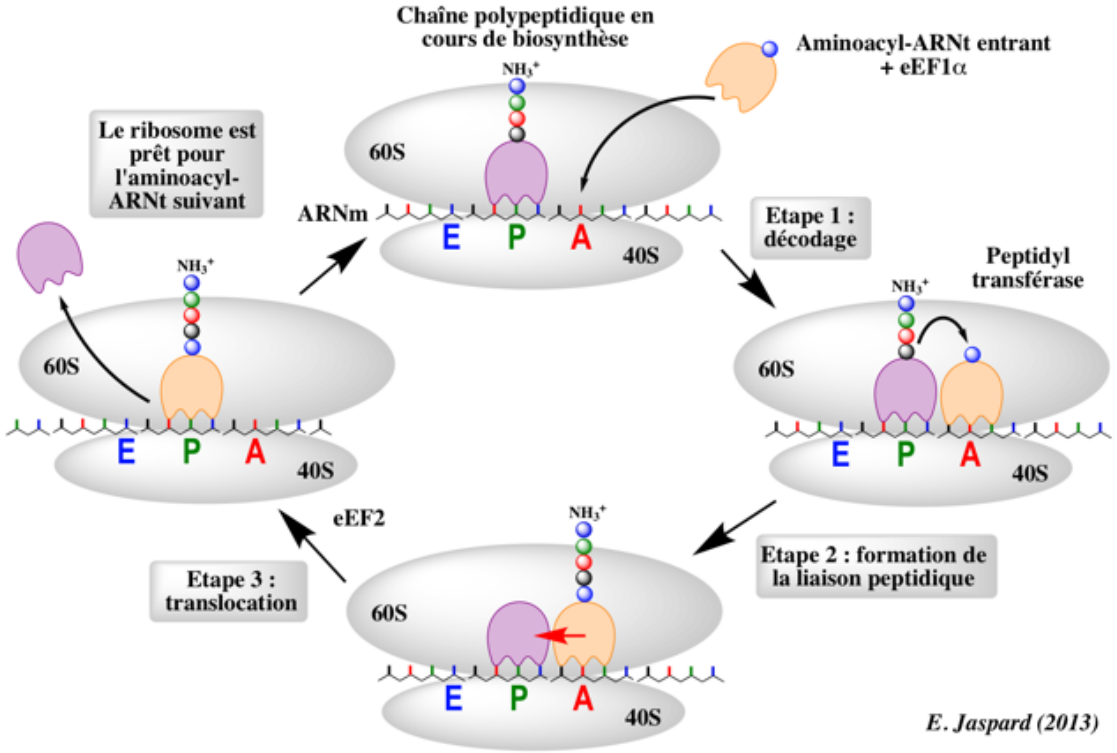


Figure 31 : Phase d'élongation de la synthèse protéique chez les eucaryotes (d'après Jaspard, 2013)

- Phase de terminaison

La phase d'élongation se poursuit jusqu'à la rencontre d'un des codons STOP (UAG, UAA ou UGA) par le ribosome. Le processus de traduction prend fin lorsque l'un de ces codons se trouve en position sur le site A. Les codons STOP ne possèdent pas d'ARNt correspondant. Les facteurs de relargage eRF1 et eRF3 reconnaissent spécifiquement ces codons. eRF1 est stimulé par eRF3-GTP formant ainsi le complexe eRF1 - eRF3 - GTP qui se lie au ribosome possédant un codon STOP à son site A. Le complexe catalyse l'hydrolyse des liaisons esters reliant la chaîne polypeptidique néosynthétisée à l'ARNt situé au site P du ribosome. La nouvelle protéine sera ainsi libérée et le ribosome pourra être soit réutilisé pour réinitialiser la synthèse d'un nouveau peptide soit être dégradé par ribophagie via un autophagosome.

3. Défaut des protéines ribosomiques et de la maturation des ARNr, activation de la p53 et altération de la traduction eu cours de l'ABD

A ce jour il est clairement établi que la biogenèse du ribosome est altérée au cours de l'ABD, faisant de cette pathologie la première ribosomopathie (Léger-Silvestre et al., 2005). L'atteinte de la maturation des ARNr est une signature de la maladie et est utilisée comme test fonctionnel de confirmation de la pathologie en cas de doute. D'autres pathologies constitutionnelles responsables d'une insuffisance médullaire peuvent également s'associer à une altération de la biogenèse du ribosome. Parmi ces pathologies se trouve le syndrome de Shwachman-Diamond ou encore la dyskératose congénitale (Liu & Ellis, 2006; Narla & Ebert, 2010). Toutes ces maladies sont liées à une mutation au niveau de gènes codant pour des protéiques impliquées dans la maturation des ARNr à différents niveaux.

a. Atteinte des RP et de la maturation des ARNr au cours de l'ABD

Les protéines ribosomiques sont toutes nécessaires à la production soit de la grande soit de la petite sous-unité du ribosome. De nombreuses études ont porté sur l'étude de la protéine RPS19, première RP retrouvée mutée dans l'ABD. L'haplo-insuffisance en une ou plusieurs protéines ribosomiques cause une diminution du taux de traduction d'un pool de transcrits érythroïdes spécifiques (Horos et al., 2012).

Différents types de mutations hétérozygotes sur un des gènes codant une protéine ribosomique ont été trouvés chez les patients. Chez la levure *S. cerevisiae*, la déplétion d'un des deux gènes *rps19* induit un défaut de la maturation de l'ARNr, particulièrement le 18S (Léger-Silvestre et al., 2005). *In vitro*, une inhibition de la protéine RPS19 donne lieu à une réduction de la maturation de la petite sous-unité 40S du ribosome parallèlement à une accumulation de la grande sous-unité 60S. L'équipe du Pr PE. Gleizes a mis en évidence qu'une haplo-insuffisance du gène *RPS24* bloque l'élimination du 5'ETS (Choesmel et al., 2008). Une haplo-insuffisance des gènes *RPS10* et *RPS26* entraîne une accumulation du pré-ARNr 18S et un défaut de maturation de la petite sous-unité du ribosome (Doherty et al., 2010) alors qu'une haplo-insuffisance des gènes *RPL35a* (Farrar et al., 2008), *RPL5* ou *RPL11*(Gazda et al., 2008) altère la maturation des ARNr de la grande sous-unité 5.8S et 28S (Figure 32).

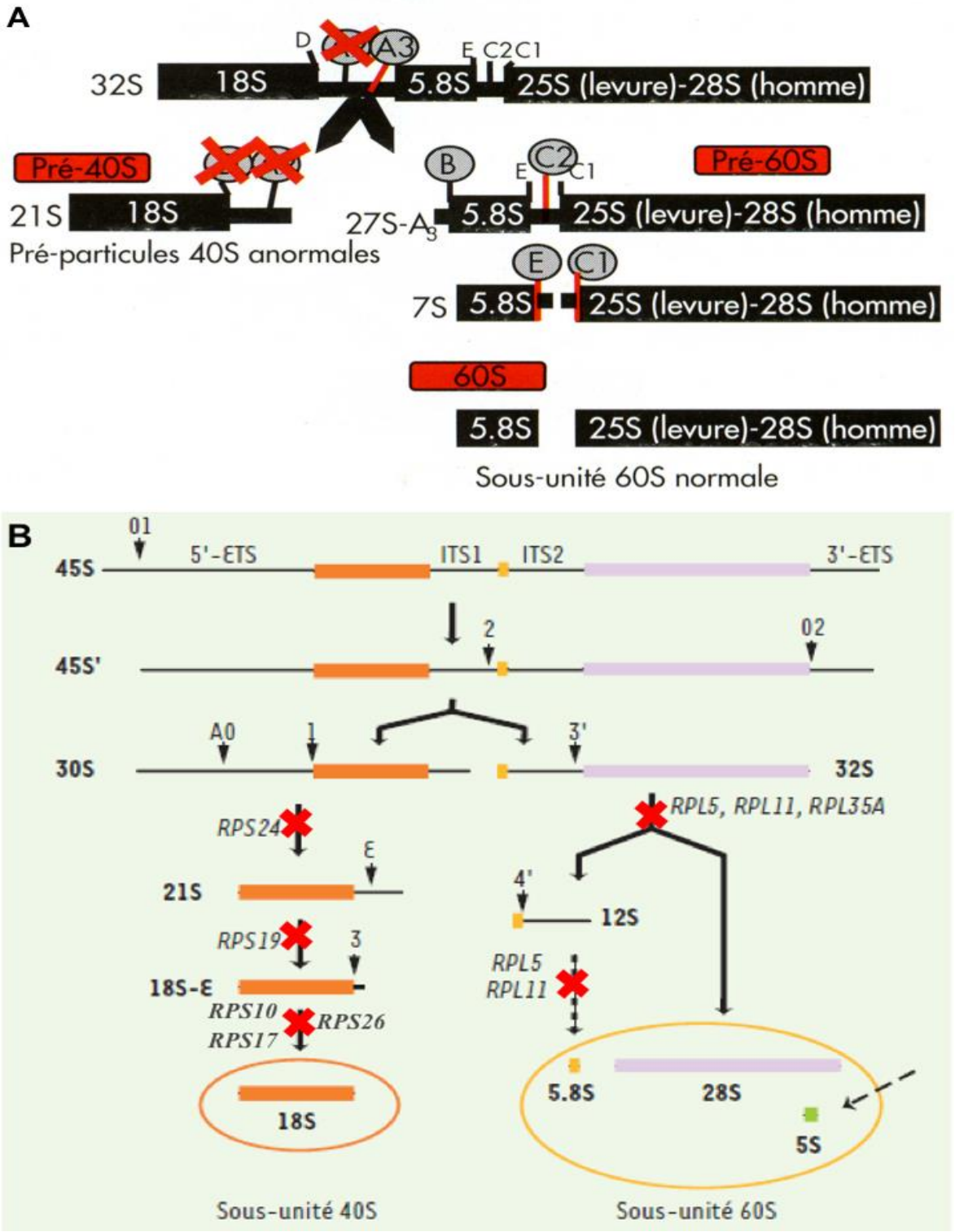


Figure 32: Anomalie de la maturation des ARNr en fonction des gènes mutés au cours de l'ABD. (A) Anomalies associées à une mutation RPS19 : absence de clivage au site A2 de l'ITS1 en 3'UTR (Da Costa et al., 2010). (B) Anomalies de maturation des ARNr 18S, 28S et 5.8S en fonction du gène RP muté (Aguissa-Tourré et al., 2009).

De nombreuses études ont porté sur les protéines ribosomiques RPL5 et RPL11. Des études chez la levure ont mis en évidence que les protéines RPL5 et RPL11 étaient liées à l'ARNr 5S et aux facteurs d'assemblage de la grande sous-unité du ribosome. D'autre part, lors d'un stress ribosomique, RPL5 et RPL11 coopèrent dans le recrutement du complexe RISC et dans la dégradation de l'ARNm de c-MYC, un proto-oncogène et facteur de transcription régulant la prolifération et la croissance cellulaire. La protéine c-Myc régule également la biogenèse des ribosomes par régulation de l'expression transcriptionnelle de certaines RP et des différents ARNr mais également de facteurs nécessaires à la maturation des ARNr, à l'assemblage des ribosomes et à l'export des particules pré-ribosomiques hors du noyau. Il a été démontré dans des cellules érythro-leucémiques de souris que c-Myc avait un rôle important lors de la phase précoce de l'érythropoïèse notamment pour la prolifération des cellules. La protéine RPL11 peut interagir avec c-Myc et réguler son activité à la baisse (Challagundla et al., 2011; M. S. Dai et al., 2007).

b. Activation de la p53 au cours de l'ABD

Le complexe 5S RPN ou RPL5/RPL11/ARNr 5S est un acteur majeur dans la régulation du checkpoint HDM2/p53 et donc par extension dans l'apoptose p53-dépendante. La protéine RPL5 se lie à l'ARNr 5S formant un complexe qui va se lier par la suite à RPL11. La formation du complexe 5S RPN est promue par le suppresseur de tumeur $p14^{ARF}$. La E3 ubiquitine ligase HDM2 (Human double Minute Homolog 2 ou Mouse DM2 pour la souris) inhibe l'activité de la protéine p53 en l'adressant au protéasome pour dégradation. Le complexe se lie à MDM2 avec ou sans $p14^{ARF}$ induisant une stabilisation de la protéine p53, un arrêt du cycle cellulaire et une apoptose (Farley & Baserga, 2016). De nombreuses RP telles que RPL5 et RPL11 peuvent se lier à HDM2 via les séquences dites TOP à leur extrémité 5'UTR. Cette liaison, en déplaçant la liaison de la p53 à son inhibiteur HDM2, va induire l'activation de la protéine p53 (Farley & Baserga, 2016) (figure 33).

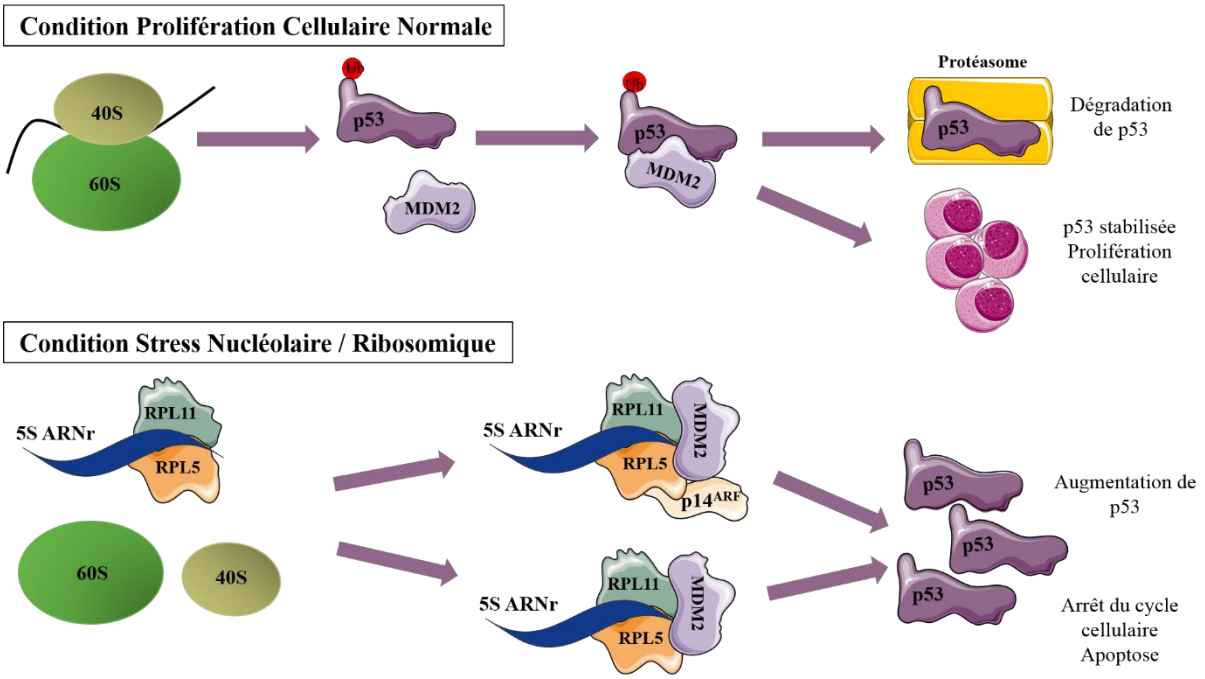


Figure 33: Modulation de la stabilisation de la protéine p53 via les protéines ribosomiques RPL5 et RPL11. La réponse au stress nucléolaire fait suite à un dysfonctionnement de la biogenèse du ribosome entraînant une accumulation de RP libres. Dans des conditions cellulaires normales, les RP constituent les ribosomes laissant ainsi MDM2 chaperonner la protéine p53 et l'ubiquitiner. La p53 est adressée au protéasome après ubiquitinylation pour la dégradation permettant ainsi une croissance et une prolifération cellulaire normale. Dans des conditions de stress nucléolaire ou ribosomique, les RP libres telles que celles du complexe 5S RNP (RPL5, RPL11 et l'ARNr 5S) s'accumulent. La formation du 5S RNP est favorisée par $p14^{ARF}$. Avec ou sans $p14^{ARF}$ le complexe 5S RNP se lie à MDM2 induisant ainsi une stabilisation de p53. L'augmentation de p53 génère un arrêt du cycle cellulaire et une apoptose (d'après Farley and Baserga., 2016).

D'autres protéines ribosomiques telles que RPL6 (Bai et al., 2014), RPL23 (Dai et al., 2004), RPL26 (Ying Zhang et al., 2010), RPL37(Daftuar et al., 2013), RPS3 (Yadavilli et al., 2009), RPS7 (Chen et al., 2007), RPS14 (X. Zhou et al., 2013), RPS15 (Daftuar et al., 2013) , RPS20 (Daftuar et al., 2013), RPS25 (X. Zhang et al., 2013) , RPS26 (Cui et al., 2014), RPS27 (X. Xiong, et al., 2011), RPS27A (Sun et al., 2011), et RPS27L (X. Xiong et al., 2011; Xiufang Xiong et al., 2014) ont été identifiées comme des régulateurs du complexe MDM2/MDMX-p53. Les protéines ribosomiques peuvent également activer p53 par d'autres voies. En effet, la

transcription de la p53 lors d'un stress nucléolaire nécessite RPL11 (Mahata, Sundqvist, & Xirodimas, 2012) ; RPL26 favorise la traduction de p53 par liaison directe sur la région 5' de l'ARNm de p53 (Ofir-Rosenfeld et al., 2008). l'accumulation de RP libres ou le déficit en une ou plusieurs RP aboutit à une biogenèse du ribosome aberrante responsable d'une augmentation du niveau d'expression de MDM2 et de p53 (S. R. Ellis, 2014) (figure 34).

Ainsi, les RP peuvent réprimer la biogenèse des ribosomes lors d'une altération de la traduction par inhibition de c-Myc. Elles peuvent également activer l'apoptose cellulaire médiée via p53 par interaction avec son régulateur HDM2.

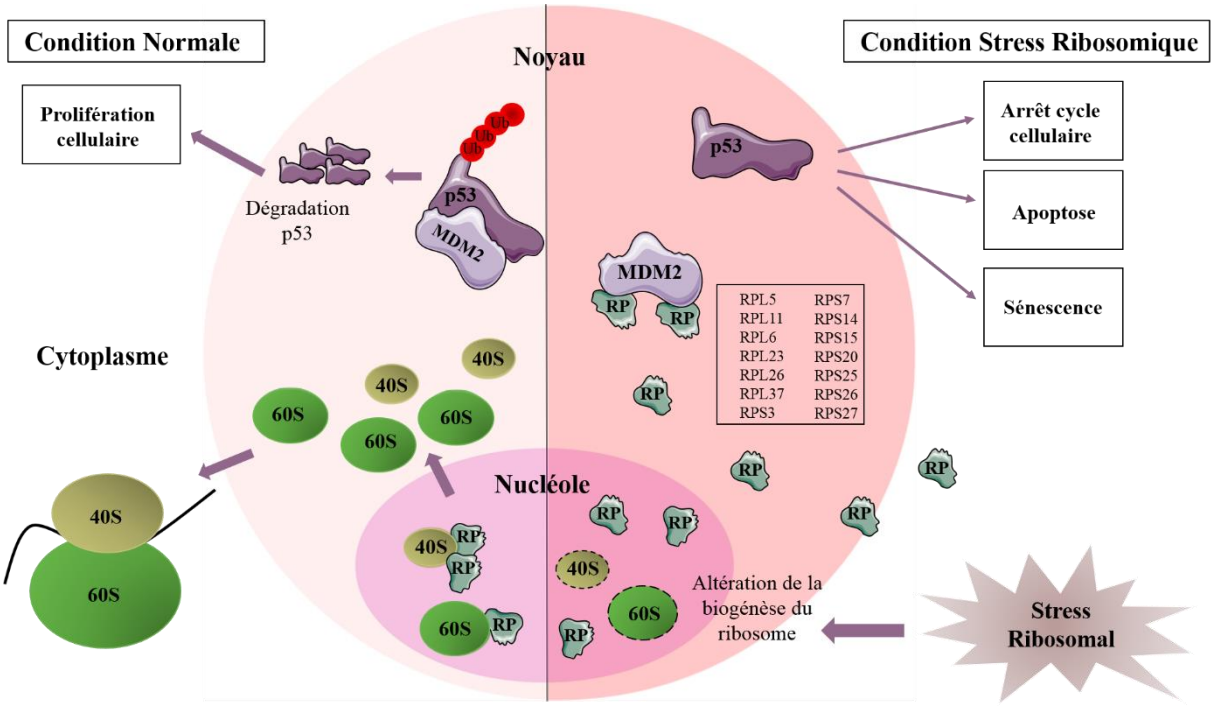


Figure 34: Activation de la voie p53 au cours de l'anémie de Blackfan-Diamond. A gauche : en condition normale, la biogenèse des ribosomes se produit dans le nucléole. Les sous-unités des ribosomes sont ensuite exportées vers le cytoplasme pour former les ribosomes matures et initier la traduction de l'ARNm. MDM2 induit une ubiquitinylation (Ub) de p53 puis sa dégradation permettant une prolifération cellulaire normale. A droite : un stress ribosomal altère la biogenèse des ribosomes et perturbe leur assemblage. Les RP sont ainsi libres et vont interagir avec MDM2 bloquant ainsi son interaction avec p53 puis sa stabilisation. Suite à cela, p53 provoque un arrêt du cycle cellulaire, une apoptose ou une sénescence (D'après Alkhatabi et al., 2016)

De nombreuses études sur des modèles animaux ont apportés la preuve de l'activation de la protéine p53 à la suite d'une haploinsuffisance en protéine ribosomique dans l'ABD. En effet, une activation de la p53 est identifiée chez la souris Dsk (dark skin) possédant des mutations dans les gènes *Rps19* ou *Rps20* (McGowan et al., 2008). Il en est de même chez le poisson zèbre après invalidation de l'ARNm de rps19 par des morpholinos (Danilova et al., 2008; Torihara et al., 2011), ou celui de rps7 (Duan et al., 2011) ou de rpl11 (Chakraborty et al., 2009; Danilova et al., 2011). Des études à partir de cellules primaires humaines en différenciation érythroïde *in vitro* ont permis de confirmer l'existence d'une activation de la protéine p53 au cours de l'ABD (Dutt et al., 2011; Gazda et al., 2012; Moniz et al., 2012). La stabilisation de p53 conduit à une accumulation des protéines p21, Bax, Noxa et engendre une induction de l'apoptose et un arrêt du cycle cellulaire au stade G_0/G1 (Dutt et al., 2011 ; Moniz et al., 2012). Cependant, le niveau d'activation de la p53 et de ses cibles est variable selon le gène muté : une haploinsuffisance en RPL5 ou RPL11 ou tout autre protéine que RPS19 conduit à une forte activation de la p53 responsable d'un défaut majeur de la prolifération érythroïde, une forte induction de l'apoptose et un ralentissement plus prononcé du cycle cellulaire (Moniz et al., 2012). La spécificité de l'implication de la p53 est démontrée par la réversion du phénotype ABD au moins en partie après l'utilisation d'inhibiteurs chimiques de la p53 (Dutt et al., 2011) ou par son invalidation après co-infections de $CD34^+$ humaines déplétées en RPS19 ou RPL5 ou RPL11 par un ARN interférent inhibant la p53 (Moniz et al., 2012). Le phénotype de l'ABD ainsi que celui d'autres insuffisances médullaires peuvent être attribués à une activation et une stabilisation de la protéine p53. Néanmoins, la compréhension de cette régulation dans le contexte de la maladie n'est pas totalement résolue (Dutt et al., 2011 ; Jaako et al., 2011 ; Moniz et al., 2012).

c. Altération de la traduction au cours de l'ABD

Bien que les ribosomes ne puissent assumer la traduction de tous les ARNm, et notamment ceux nécessitant des conditions spécifiques pour l'initiation de la traduction, le nombre réduit de ribosomes et leur activité est suffisante pour la survie cellulaire (Ludwig et al., 2014). Les données obtenues sur des études de l'hématopoïèse suggèrent qu'un niveau d'expression complet de la protéine GATA-1 semble essentiel à la promotion d'une érythropoïèse normale. Cela suggère l'hypothèse selon laquelle les mutations de protéines ribosomales observées chez les patients atteints d'ABD pourraient entraîner une anémie en

réduisant la production de la protéine GATA-1 et relieraient ainsi ces deux ensembles de lésions moléculaires apparemment disparates (Ludwig et al., 2014). Il est important de noter que les taux d'ARNm de GATA-1 totaux ne semblent pas être affectés. Cela concorde avec la diminution des taux de protéine GATA-1 due à une traduction réduite. Cette observation est cohérente avec le concept selon lequel la disponibilité de ribosomes libres est l'étape limitant le débit de l'initiation de la traduction (Shah et al., 2013). La réduction de la traduction de GATA-1 accompagnée d'une réduction des taux de protéines ribosomiques reflète une sensibilité de l'ARNm de GATA-1 à des altérations de l'initiation de la traduction (Shah et al., 2013). Une importante régulation à la baisse des ensembles de gènes cibles de GATA-1 a été observée dans les progéniteurs érythroïdes de patients ABD. La traduction sélectivement altérée résultant de l'haplo-insuffisance protéique ribosomale fournit un paradigme pour comprendre les anomalies spécifiques à un type de cellule observées auparavant dans l'ADB (Ludwig et al., 2014 ; Khajuria et al., 2018). De plus, une récente étude a montré que l'épissage modifié de GATA-1 réduisant les niveaux de la forme normale de ce facteur de transcription peut reproduire le phénotype de la maladie (Abdulhay et al., 2019).

C. Rôle de HSP70 et de GATA-1 et leur implication dans le défaut de l'érythropoïèse au cours de l'ABD

La protéine HSP70 est une protéine inductible de stress qui s'est révélée être une protéine anti-apoptotique de l'érythropoïèse. En effet, elle est connue pour protéger le principal facteur de transcription érythroïde GATA-1 du clivage induit par la caspase-3 au cours de la différenciation érythroïde terminale normale après stimulation par l'EPO. La protéine HSP70 limite l'activation de la caspase-3 en limitant l'induction de l'apoptose par interaction avec Apaf-1.

De nombreux groupes ont mis en évidence la présence d'une accumulation de HSP70 dans les précurseurs érythroïdes. HSP70 est constitutivement et fortement exprimé dans le cytoplasme et le noyau des érythroblastes humains normaux (Ribeil et al., 2007). Ces observations ont permis de suggérer l'importance du rôle de HSP70 au cours de l'érythropoïèse. GATA-1 est indispensable à la différenciation érythroïde. Il est clivé par la caspase 3 dans les érythroblastes immatures mais ne l'est pas dans les érythroblastes les plus matures. En 2007, l'équipe du Pr Olivier Hermine a étudié la régulation de HSP70 lors de la transduction du signal

de la voie EPO/EPOR ainsi que son rôle dans la protection de GATA-1. En présence d'EPO au cours de la différenciation érythroïde terminale, la protéine est localisée dans le noyau et protège GATA-1 du clivage de la caspase 3. En revanche, lors d'une déprivation en EPO, HSP70 est délocalisée du noyau au cytoplasme, GATA-1 est alors clivée par la caspase 3 menant à un arrêt de la maturation érythroïde et à un processus d'apoptose. Ceci induit une diminution de la prolifération, un arrêt ou un retard de la différenciation érythroïde et un excès d'apoptose. De plus, il semblerait que des cibles de HSP70 soient présentes dans le cytoplasme des cellules érythroïdes. Leur interaction favoriserait la survie des cellules via une protection des protéines cibles et les préviendrait de l'apoptose (Frisan et al., 2012). Ainsi le complexe HSP70/GATA-1 constitue un élément régulateur de la production des hématies.

Notre équipe a précédemment démontré *in vitro* l'existence de 2 phénotypes distincts dans l'ABD (Moniz et al., 2012) : i) un phénotype présentant une diminution de la prolifération sans affecter la différenciation érythroïde ni le niveau d'apoptose secondaire à l'haplo-insuffisance en RPS19 et ii) un phénotype secondaire à une haplo-insuffisance en RPL5 ou RPL11 ou tout autre gène autre que *RPS19* qui diminue considérablement la prolifération des cellules érythroïdes, retarde leur différenciation et induit largement l'apoptose. Le chaperon HSP70 est impliqué à la fois dans la différenciation érythroïde et la survie cellulaire et pouvait expliquer la dualité de ces deux phénotypes au cours de l'ABD. C'est pourquoi notre équipe a récemment étudié le rôle de la protéine GATA-1 et de son chaperon HSP70 dans l'anémie de Blackfan-Diamond avec l'hypothèse que la protéine HSP70 pourrait avoir un rôle majeur dans l'érythroblastopénie de la maladie. Nous avons ainsi pu montrer que l'expression de la protéine HSP70 est considérablement réduite dans les cellules érythroïdes issues de patients atteints d'ABD présentant une mutation hétérozygote RPL5, RPL11 ou RPS24 tout en étant préservée dans les cellules haplo-insuffisantes en RPS19. Ces résultats validaient des résultats obtenus après infection lentivirale de $CD34^+$ humaines issues de sang de cordon par des ARN interférents spécifiques de RPL5 ou RPL11 (Gastou et al., 2017). La diminution de l'expression de la protéine HSP70 dans les cellules déplétées en RPL11 ou RPL5 est liée à une dégradation par le protéasome de HSP70 polyubiquitinylée. Après une déplétion en RPL5 ou RPL11 des cellules primaires humaines et l'isolement des progéniteurs érythroïdes BFU-e et CFU-e par cytométrie en flux, l'équipe a pu montrer que le défaut de HSP70 survient très précocement au cours de l'érythropoïèse. Il est présent dès le stade des BFU-e et est majeur au stade CFU-e. L'équipe a ensuite confirmé l'importance de HSP70 dans le défaut de l'érythropoïèse au cours de l'ABD en procédant à la restauration du niveau d'expression de HSP70 par une infection des

$CD34^+$ issus de sang périphérique de patients ABD ou en co-infection par des shRPL5 ou des shRPL11 avec un lentivirus ARN sauvage spécifique du chaperon HSP70. Dans les cellules érythroïdes humaines haploinsuffisantes en RPL11 (patients ABD), la surexpression de la protéine HSP70 sauvage réduit l'activation de la protéine p53, diminue l'apoptose, améliore l'expression des chaînes de globine et réverse le défaut érythroïde. Une amélioration importante de la prolifération des progéniteurs et une restauration de la différenciation terminale ont été observées. La surexpression de HSP70 est donc capable de restaurer un phénotype sauvage des cellules déplétées ou haploinsuffisantes en RPL11. Cette observation n'a pas été rapportée dans le cas de l'étude des cellules érythroïdes humaines possédant une haploinsuffisance en RPS19, la protéine HSP70 étant à un niveau d'expression normal.

La dégradation de HSP70 par le protéasome entraîne un clivage de GATA-1 et par conséquent une atteinte de la prolifération et de la survie cellulaire érythroïde avec une induction de l'apoptose. La dégradation par le protéasome de HSP70 n'est pas due à l'activation de la protéine p53. Cependant, la surexpression de HSP70 peut réduire la stabilisation de p53. Ainsi, l'activation de p53 est aussi une conséquence d'une régulation négative de GATA-1 en réponse à un défaut de son chaperon HSP70 dans les cellules érythroïdes déplétées en RPL5 ou RPL11. Les données obtenues *in vivo* permettent de suggérer que le chaperon HSP70 a un rôle clé dans la détermination de la sévérité du phénotype érythroïde de la maladie en fonction de la mutation identifiée. La régulation de l'expression du chaperon HSP70 au cours de la différenciation érythroïde peut donc expliquer l'observation des deux phénotypes distincts dépendant de la mutation de la protéine ribosomique. Ces résultats impliquent que HSP70 joue un rôle non seulement au cours de la phase terminale de la différenciation érythroïde mais également dans la prolifération des cellules progénitrices. L'étude démontre que la protéine HSP70 pourrait être l'un des principaux modificateurs génétiques dans les variations de la sévérité de la maladie et est une protéine clé des mécanismes physiopathologiques de l'ABD (Gastou Marc et al., 2017) (figure 35).

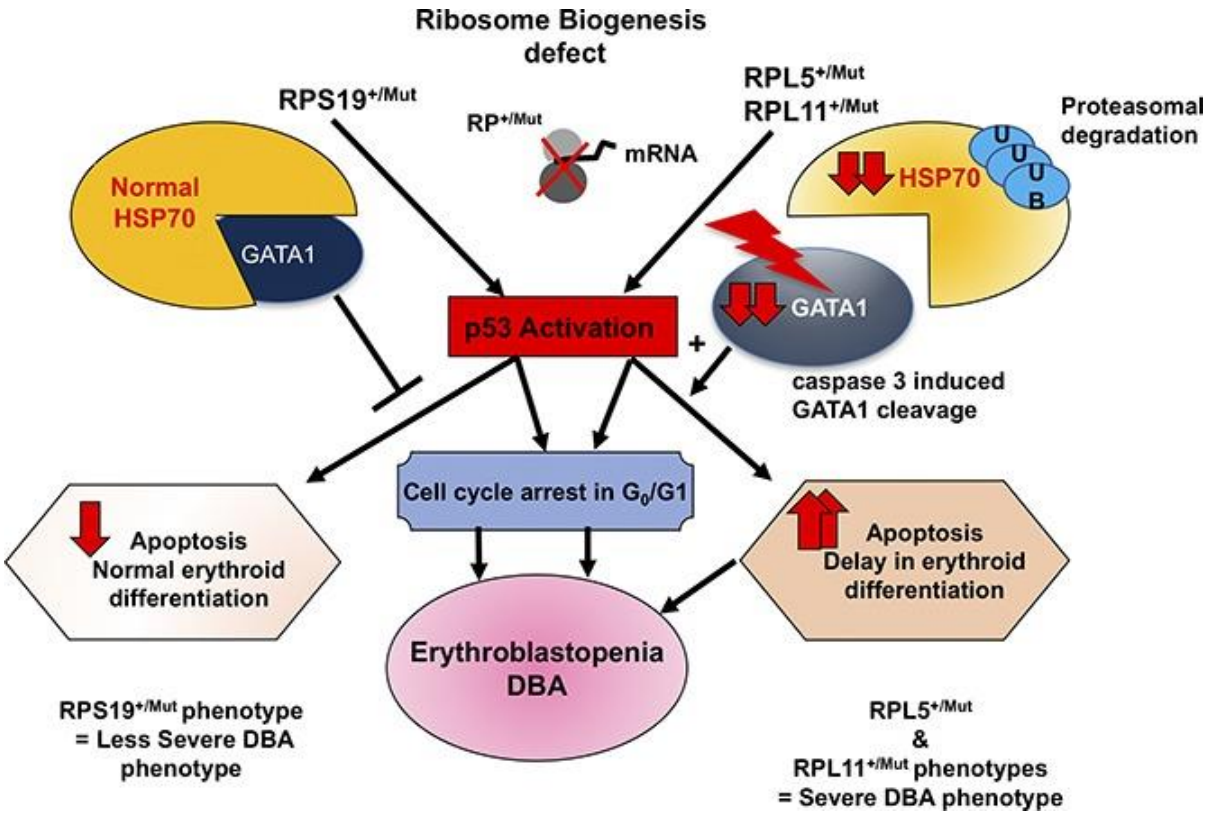


Figure 35: Les différents phénotypes de l'Anémie de Blackfan-Diamond modulés par la protéine HSP70.

En parallèle de cette étude, notre équipe s'est également intéressée au rôle de la protéine HSP70 dans le contrôle de la balance de la synthèse hème/globine. Partant de l'hypothèse qu'un déséquilibre entre la synthèse de l'hème et des chaînes de globines pourrait avoir un rôle dans l'érythroblastopénie caractéristique de l'anémie de Blackfan-Diamond, nous avons pu identifier ce déséquilibre dans les cellules érythroïdes de patients atteints d'ABD. Ce déséquilibre conduit à une accumulation en excès d'hème libre qui aboutit en retour à une production accrue de formes réactives de l'oxygène (ROS) (Rio et al., Blood 2019). Les expériences montrent encore une dualité phénotypique avec un déséquilibre plus important dans les cellules érythroïdes haplo-insuffisantes en RPL5 ou RPL11 que dans celles haplo-insuffisantes en RPS19. Les résultats confortent l'existence de 2 phénotypes *in vitro* au cours de l'ABD. Pour la première fois, il a été démontré que le défaut de la globine et l'excès d'hème libre sont présents dès le stade CFU-e dans les cellules érythroïdes primaires $CD34^+$ déplétées en RPL5 ou RPL11. Après

les premiers résultats encourageants obtenus sur l'implication de la protéine HSP70 dans la dualité des deux phénotypes de l'ABD selon le gène muté et notamment dans le phénotype dit sévère, l'équipe a étudié le métabolisme de l'hème après surexpression de la protéine HSP70 sauvage dans les cellules érythroïdes déplétées en RPL5 ou RPL11. L'axe HSP70/GATA-1 a été exploré avec l'hypothèse que cet axe est impliqué dans l'excès d'hème libre dans les cellules érythroïdes ABD. Le sauvetage de HSP70 mène au rétablissement du niveau d'expression de GATA-1. Il permet également d'augmenter la synthèse des globines réduisant ainsi l'excès de l'hème libre. Par sa régulation sur GATA-1, HSP70 joue également un rôle dans la régulation des cibles de GATA-1 impliquées dans le métabolisme de l'hème comme HRI ou l'ALAS2 (δ-aminolevulinate synthase 2). HSP70 est un facteur primordial impliqué dans le déséquilibre entre la synthèse de l'hème et de la globine. La surexpression de HSP70 augmente l'expression des globines α et β. Ces évènements entraînent une diminution de l'apoptose dans les cellules érythroïdes de patients ABD. De ce fait, l'importance de HSP70 dans l'ABD est liée à sa régulation de l'expression de GATA-1 (Rio et al., 2019). Le déséquilibre entre la synthèse des chaînes de globine et l'hème libre au cours de l'ABD a également été montré par une autre équipe confortant les résultats obtenus (J. Xu et al., 2018). Une nouvelle étude portant sur la relation entre GATA-1 et l'hème dans les cellules érythroïdes précoces appuie ces dernières conclusions. L'hème augmente les transcrits des protéines ribosomiques suggérant que l'hème puisse garantir une quantité suffisante de ribosomes pour la synthèse des globines. L'hème diminue également l'expression du gène *GATA-1* et de ces cibles. L'étude révèle une boucle autorégulatrice entre GATA-1 et l'hème impliquant à la fois GATA-1 et l'hème comme régulateurs du processus de différenciation érythroïde physiologique. En effet, GATA-1 initie la synthèse de l'hème, et ensemble ils dirigent la maturation des globules rouges. Puis l'hème va inhiber la synthèse de GATA-1. En outre, un excès d'hème peut augmenter le déséquilibre en protéines ribosomiques, abaisser prématurément la traduction de GATA-1 (Doty et al., 2019) (figure 36).

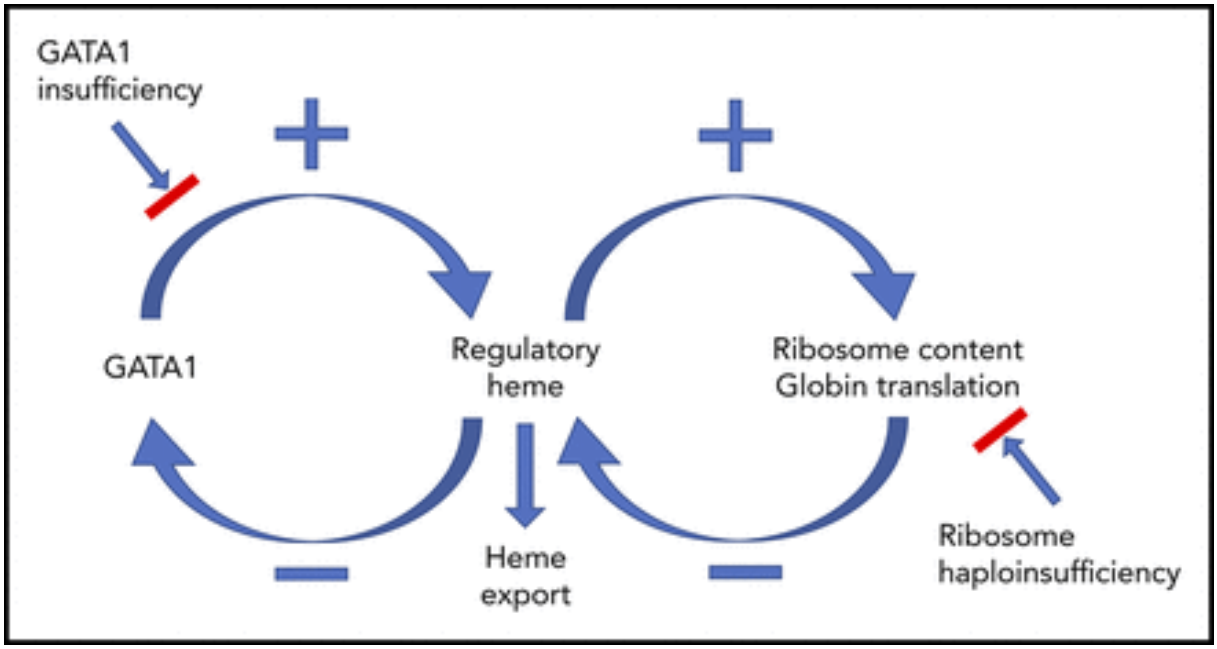


Figure 36: Schématisation de la boucle rétrocontrôle entre GATA-1 et l'hème au cours de la différenciation des globules rouges (Doty et al., 2019).

Chapitre 3 : Les protéines chaperons et les chaperons du ribosome

Les mécanismes régissant une cellule font intervenir des protéines qui interagissent entre-elles et/ou avec des substrats afin d'assurer le bon fonctionnement de la machinerie cellulaire. En situation défavorable, des systèmes d'adaptation se mettent en place et différents mécanismes cellulaires de réponse au stress vont être induits. Parmi eux, les protéines chaperons, exprimées chez tous les organismes ont un rôle primordial dans la réponse à un stress cellulaire (Ellis & Hemmingsen, 1989). Leurs rôles sont i) de limiter le repliement et l'assemblage à d'autres protéines, ii) de protéger les protéines contre l'agrégation, iii) de contribuer à la re-sobulisation des agrégats protéiques et à la restitution des conformations natives des protéines endommagées (Mogk et al., 2003 ; Schlieker, Bukau, & Mogk, 2002) et iv) de dégrader les protéines ayant subi des modifications importantes ne pouvant plus retrouver leur conformation initiale (Sauer et al., 2004). Ainsi, les protéines chaperons empêchent la formation de protéines incorrectes dans la cellule pouvant induire un dérèglement cellulaire. Elles peuvent également jouer un rôle dans le transport de protéines et dans la régulation d'un signal intracellulaire (Vos et al., 2008).

Les chaperons sont donc des protéines primordiales lors de situation de stress environnemental pathologique ou de stress cellulaire physiologique. Ils ont par ailleurs un rôle important au cours de l'érythropoïèse via un contrôle des voies de l'apoptose. Parmi ces protéines chaperons, les protéines HSP (Heat Shock Proteins) interviennent dans l'érythropoïèse en protégeant les érythroblastes de l'apoptose au cours de l'activation du récepteur à l'EPO (Weiss & Santos, 2009).

I. Les protéines de chocs thermiques

Tout organisme exposé à des températures élevées induit une expression rapide et transitoire de protéines spécifiques : les HSPs. En 1962, Ritossa fournit la première description des manifestations cellulaires de la « réponse au choc thermique » chez la drosophile (Ritossa F.,1962). Douze ans après, Tissieres et ses collaborateurs identifièrent les protéines responsables de cette réponse : les HSPs (Tissieres A et al., 1974). Le rôle protecteur des HSPs a été mis en évidence en 1982 (Li & Werb, 1982). Les HSPs représentent l'une des familles de

protéines les plus hautement conservées génétiquement entre les organismes. L'exposition d'une cellule à un choc thermique chez l'Homme induit trois étapes successives :

- L'étape d'altération conduisant à la dénaturation des protéines puis à la perte de leur fonction ainsi qu'à la formation d'agrégats protéiques insolubles (Nguyen et al., 1989)
- L'étape de réponse au choc thermique se caractérisant par l'activation transcriptionnelle des gènes *HSP* via des facteurs de transcription se liant à l'ADN au niveau de séquences spécifiques situées dans le promoteur (les HSE pour Heat Shock Element). Cette liaison induit la synthèse des HSPs.
- L'étape de récupération corrigeant les altérations morphologiques et permettant aux protéines de retrouver des activités normales.

A. Classification des HSPs et leurs fonctions

Les HSPs sont regroupées en six familles en fonction de leur poids moléculaire : HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP47 et les petites HSP dont le poids moléculaire est compris entre 12 et 42 kDa. La plupart des HSPs (HSP60, HSP90, HSP100) sont exprimées de manière constitutive et participent au maintien de l'homéostasie cellulaire (Tanguay, Wu, & Khandjian, 1993; Wickner, Maurizi, & Gottesman, 1999). D'autres HSP sont exprimées en condition de stress et sont inductibles (HSP70). Bien que les HSPs partagent des propriétés communes et un fort taux d'homologie, chaque famille possède leurs propres particularités. Nous nous concentrerons sur les autres HSP70 que celle décrite comme impliquée dans l'ABD (HSP70A/HSP70B décrite précédemment) pour s'intéresser à HSPA14, un membre de la famille des HSP, chaperon du ribosome.

1. Familles des HSP70

Les HSP70 sont composées de protéines codées par 6 gènes et 27 pseudogènes permettant l'expression des protéines HSP701A, HSP701B HSP701L, HSP70-2, HSP70-6, HSP70-8, HSP70-5 et HSP70-9, huit sous-familles regroupées indifféremment sous le nom de

HSP70 (Brocchieri et al., 2008) (tableau 5). En condition de stress, le facteur de transcription HSF-1 (Heat Shock Factor-1) se lie au promoteur de ces gènes induisant ainsi une expression de HSP70. Bien que principalement cytosolique HSP70 peut être relocalisée au noyau pour participer à l'assemblage et la translocation des ribosomes en condition de stress (Velazquez & Lindquist, 1984; Welch & Suhan, 1986). Les hétérodimères HSP70/HSP110 forment des NEFs (Nucleotide Exchange Factors) et coopèrent ensemble dans le repliement correct de protéines cibles (Schuermann et al., 2008). Assisté de HSP40, HSP70 permet la reconnaissance de protéines irréversiblement endommagées qui seront ubiquitinylées puis adressées au protéasome. Par ailleurs, avec HSP90, HSP40 et d'autres protéines telles que HIP (HSC70 Interacting protein), HOP (HSP70-HSP90 Organizing protein) et BAG1 (Bcl-2-associated athanogene-1), HSP70 génère un signal d'adressage à la dégradation lysosomale des protéines (Agarraberes & Dice, 2001). Ainsi, HSP70 agit tel un contrôleur de qualité des protéines. HSP70 est également impliquée dans la sénescence et semble avoir un rôle dans la survie cellulaire au cours de cancers. La régulation négative de HSP70 déclenche la sénescence cellulaire via l'activation et la stabilisation la protéine p53 accompagnée d'une induction de p21, l'inhibiteur du cycle cellulaire (Yaglom, Gabai, & Sherman, 2007). Certaines données suggèrent que HSP70 participe à la stabilisation des membranes du lysosome et favorise l'autophagie. Ces deux mécanismes permettent aux cellules d'échapper à la mort cellulaire (Daugaard, Rohde, & Jäättelä, 2007; Kirkegaard et al., 2010; Leu et al., 2009; Nylandsted et al., 2004). HSP70 est également impliqué dans la régulation de l'apoptose médiée par le TNF via le complexe protéique HSP70-1/CHIP/Ask-1. Cette association de la E3 ubiquitine ligase CHIP et de HSP70 induit la dégradation par le protéasome de Ask-1 (Gao et al., 2010). Outre cette association, HSP70 peut agir en amont (Park et al., 2001; Stankiewicz et al., 2005) et en aval de l'activation des caspases (Buzzard et al., 1998). Via des interactions avec des protéines régulant l'apoptose (Bax, APAF-1), HSP70 peut inhiber l'apoptose médiée par les caspases (Beere et al., 2000; Saleh et al., 2000). La plupart des cellules cancéreuses surexpriment HSP70 ce qui leur confère une tumorogénécité augmentée (Rappa et al., 2012; Seo et al., 1996). Une récente étude a montré qu'une déplétion en HSP70 altérait l'initiation et la progression du carcinome hépatocellulaire. En effet, il semblerait que la protéine HSP70 contrôle l'initiation et la progression du cancer en régulant les voies de signalisation des dommages à l'ADN et de la mitophagie. Les auteurs ont montré que la perte de HSP70 pouvait empêcher la transformation maligne diminuant ainsi l'échappement des cellules initiatrices de tumeurs. Ceci limiterait leur prolifération et la transformation cellulaire. Ils ont conclu de leurs résultats

qu'une modulation de la fonction de HSP70 pouvait être une stratégie pour lutter contre la transformation et la propagation des cellules tumorales (Cho et al., 2019). Enfin les HSP70 ont un rôle dans l'immunité en participant à la surveillance cellulaire liée à divers pathogènes. Par leur présence au niveau des TLR-4 (Toll-like receptor 4), HSP70 ainsi que HSP90 sont impliquées dans le mécanisme de reconnaissance de pathogène (PAMPs) (Triantafilou & Triantafilou, 2004). Il a été mis en évidence que les HSP70 étaient impliquées dans la médiation de la propagation des prions (Mayer & Bukau, 2005). De plus, même en absence d'immunogène, combinée avec des cytokines pro-inflammatoire telles que IL-2 ou IL-15, HSP70 possède la capacité de stimuler l'activité cytolytique des cellules NK (Natural Killer) contre les cellules tumorales (Multhoff et al., 2001).

Protéine	Nom alternatifs	Localisation chromosomique	Expression cellulaire	Localisation subcellulaire	Mode d'expression
HSP70-1A	HSP70, HSP72, HSP70-1	6p21.3	Ubiquitaire	Cytosol, Noyau, lysosome après stress	Fortement induite par stress
HSP70-1L					
HSP70-1L	HSP70-hom	6p21.3	Cellules germinales	Cytosol, Noyau	Constitutive
HSP70-2	HSP70-3 HSPA2B	14q24.1	Cellules germinales et cerveau	Cytosol, Noyau	Constitutive
HSP70-5	HSPA6, HSP70B'	1q23.3	Cellules dendritiques monocytes, Natural Killer	Cytosol, Noyau	Induite par choc thermique
HSP70-6	HSC70, HSP73	11q24.1	Cerveau, cellules sanguines	Cytosol, Noyau après stress	Constitutive modérement induite par stress
HSP70-8	BIP, GRP78	9q33.3	Cellules sécrétrices (thyroïde, pancréas)	Réticulum endoplasmique	Induite par stress du RE
HSP70-9	HSPA9, GRP75, mHSP75, mortaline	5q31.2	Nombreux tissus	mitochondrie	Constitutive

Tableau 5: Présentation de quelques membres de la famille HSP70

2. Une HSP70 : HSPA14

a. Structure et expression de HSPA14

La protéine HSPA14 également appelée HSP70L1 est une protéine de 509 acides aminés avec une masse moléculaire d'environ 55kDa, qui appartient à la famille des HSP70.

Elle est codée par le gène *HSPA14* situé sur le chromosome 10. La protéine HSPA14 possède un profil d'expression spécifique à chaque tissu. Alors que son niveau d'expression est plus élevé dans le foie, les testicules et les muscles, il est retrouvé plus faible dans les autres tissus (Han et a., 2017). La protéine HSPA14 est structurellement et fonctionnellement similaire à HSP70.

b. Principales fonctions cellulaires

Chez les mammifères, la protéine HSPA14 est un composant du complexe associé au ribosome (RAC). Il s'agit d'un hétérodimère composé des protéines chaperons HSPA14 et HSP40 (précisément DNAJC2). HSPA14 est associée au chaperon MPP11 pour former ce complexe RAC. MPP11, une protéine multifonctionnelle impliquée dans le contrôle de la transcription forme un complexe stable avec HSPA14 (Otto et al., 2005). Le RAC se lie aux polypeptides naissants et les maintient dans un état actif tandis que la protéine DNAJC2 induit une activation de HSPA14 en stimulant son activité ATPase. En d'autres termes, le complexe RAC empêche l'agrégation des protéines pendant la traduction. Cette agrégation peut entraîner le pliage anormal de la protéine néosynthétisée ou le maintien accessible des substrats aux différentes ligases E3.

La protéine HSP extracellulaire agit également comme un puissant adjuvant polarisant des cellules auxiliaires T (Th1) – cellules contribuant à la réponse immunitaire - par l'activation des cellules dendritiques. HSPA14 se lie directement au récepteur TLR4 (Toll-like receptor 4) présent à la surface des cellules dendritiques. D'une part, cette liaison active les voies MAPK et NK-κB, d'autre part, elle augmente l'expression du CD40 (récepteur du TNF), du CD80 (récepteur de la protéine CD28 dont l'expression est requise pour l'activation et la survie des lymphocytes T), du CD46 (inhibe le système du complément du système immunitaire innée) et favorise la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires du TNF-α, IL-1β et IL-12 et des chimiokines IP-10 et MIP-1α -macrophage inflammatory protein 1- α) (H. Fang et al., 2011; Wan et al., 2004). La même équipe a récemment démontré que la protéine HSPA14 intracellulaire inhibait la maturation des cellules dendritiques en supprimant l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Pour cela, HSPA14 intracellulaire inhibe le recrutement de Ash1l – un facteur de transcription – et maintien les modifications répressives de H3K27me et H2AK119Ub1- respectivement sur les complexes PRC1 et PRC2 (polycomb repressive complex 1 et 2) – sur les régions promotrices des gènes co-stimulants CMH et

STAT3. Ces deux complexes contrôlent l'expression génique via l'organisation de la structure de la chromatine. Plus précisément, HSPA14 intracellulaire fonctionne tel un inhibiteur de la maturation des cellules dendritiques dérivées des monocytes (MoDC). Faiblement exprimée au début de la différenciation des MoDC, l'augmentation progressive de l'expression de HSPA14 bloque la suractivation des MoDC en modulant leur maturation de manière appropriée. Ainsi, une régulation fine de HSPA14 aux différents stades de différenciation est nécessaire et constitue un mécanisme d'autorégulation (Yi et al., 2019). En revanche, une étude a montré que HSPA14 pourrait ne pas avoir de rôle dans la réponse immunitaire (Han et a., 2017).

Une étude réalisée sur l'induction de la protéine HSPA14 par NBS1 – une protéine appartenant au complexe MRN, un acteur central associé à la réparation des cassures double brins – identifie une nouvelle voie : l'axe NSB1-HSF4b-HSPA4/HSPA14. Cette voie peut induire la migration, l'invasion et la transformation cellulaire. La déplétion de HSPA14 entraîne une réduction de l'activité de migration et d'invasion des cellules (Wu et al., 2011). De plus, HSPA14 est l'une des protéines retrouvées surexprimées dans les tissus tumoraux du carcinome hépatocellulaire (Z. Yang et al., 2015).

Une récente étude met en évidence une nouvelle fonction de HSPA14. La protéine interagit directement avec la protéine SLC6A14 – un transporteur spécifique des neurotransmetteurs (Rudnick et al., 2014) - lors du repliement du transporteur dans la membrane du réticulum endoplasmique. HSPA14 serait ains impliquée dans le transport intracellulaire de protéines à la surface de la cellule (Rogala-Koziarska, Samluk, & Nałęcz, 2019).

A ce jour, aucun lien n'a été mis en évidence entre la protéine HSPA14 et l'érythropoïèse.

c. Régulations connues de la protéine HSPA14

La protéine HSPA14 est une protéine récemment identifiée et sa régulation n'est pas encore totalement comprise. Comme toutes les protéines HSP, HSPA14 est induite lors d'un stress environnemental tel qu'une variation de température. L'expression de HSP70 peut être induite par une surexpression de la protéine nibrine (NBS-1, p95), une protéine de réparation de l'ADN, contribuant ainsi à l'activité métastatique et à la transformation cellulaire induite par NBS-1 (Wu et al., 2011 ; Radons, 2016).

La stabilisation de la protéine HSPA14 intracellulaire dépend de DNAJC2 (DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C2), un régulateur épigénétique. En effet, la déplétion de DNAJC2 diminue l'expression de HSPA14 prouvant l'importance de DNAJC2 dans l'expression du chaperon HSPA14. En microscopie confocale, il a été montré une colocalisation de HSPA14 et DNAJC2 dans le cytoplasme au cours des stades intermédiaires de la différenciation des MoDC. En revanche, au cours des stades avancés, leur colocalisation est réduite mais leur localisation nucléaire est évidente. Cela suggère que les deux molécules ont des fonctions nucléaires différentes lors des stades terminaux de la différenciation des MoDC. De plus, DNAJC2 présente une dynamique d'expression similaire à celle de HSPA14. DNAJC2 peut donc jouer un rôle dans la stabilisation cytoplasmique de HSPA14 mais ne semble pas intervenir dans le compartiment nucléolaire (Figure 37) (Yi et al., 2019).

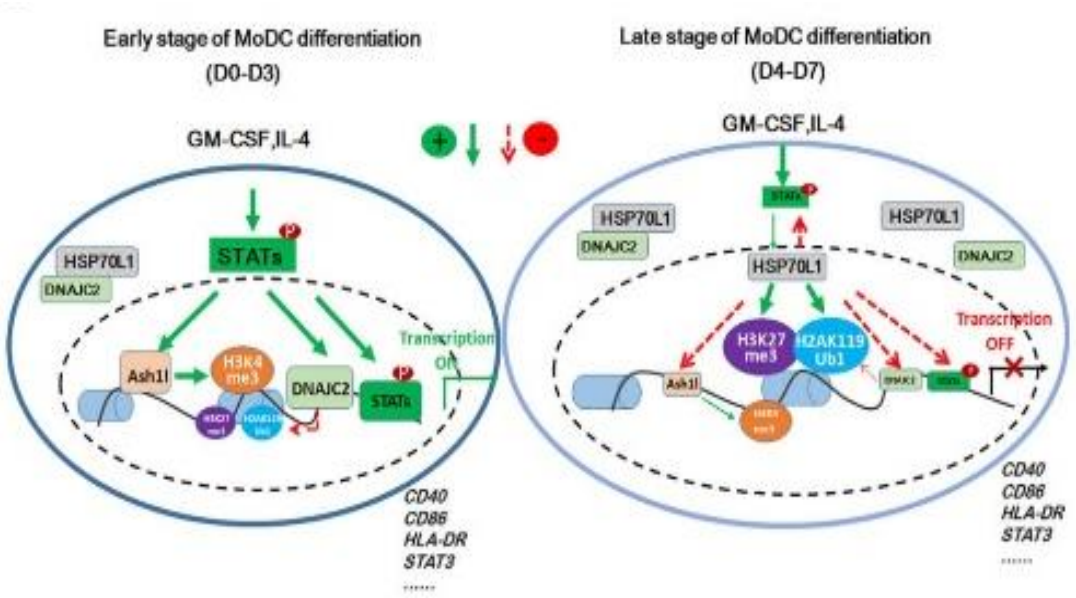


Figure 37: Schéma mécanistique de la protéine HSPA14 intracellulaire inhibant la maturation des cellules dendritiques dérivés des monocytes (MoDC) (Yi et al., 2019).

II. Les protéines chaperons du ribosome et des protéines du ribosome

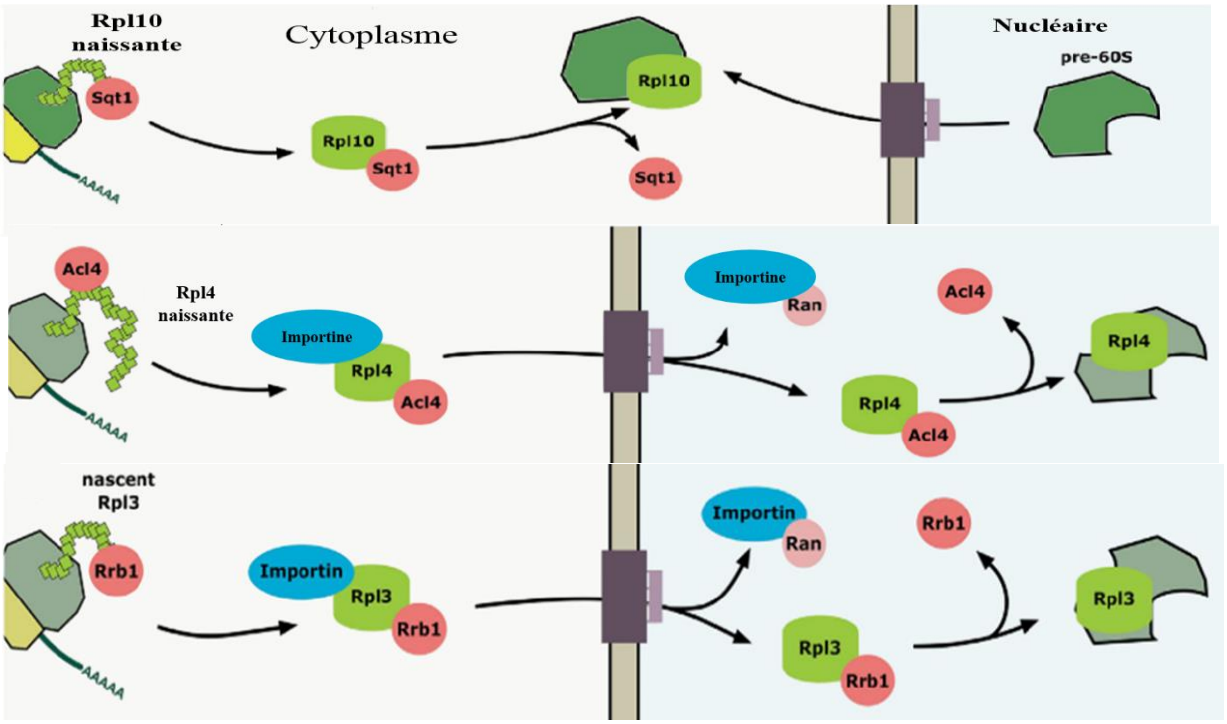
A. Généralités sur les chaperons des RP et ribosomes

Dans toutes les cellules du vivant, des procaryotes aux eucaryotes, les ribosomes remplissent le rôle essentiel de la synthèse protéique (Melnikov et al., 2012). Les protéines ribosomiques contiennent des régions basiques ainsi que des extensions non repliées formant des interactions avec les ARNr au sein du ribosome (Ben-Shem et al., 2011). Ces caractéristiques peuvent subir des interactions non spécifiques entraînant une insolubilité (Jäkel et al., 2002). C'est pourquoi des mécanismes sont nécessaires pour la protection de ces RP nouvellement synthétisées. Au cours de ces dernières années, plusieurs protéines interagissant avec les protéines ribosomiques et/ou les escortant vers leur site d'assemblage ont été identifiées. A l'inverse des HSP cytosoliques, d'autres chaperons cellulaires sont associés à la traduction des ribosomes et sont engagés dans le repliement de protéines néosynthétisées (Albanèse et al., 2006). Ces protéines se lient spécifiquement à une protéine ribosomique et sont appelées « chaperons dédiés » (Pausch et al., 2015) ou chaperons du ribosome.

Ces chaperons dédiés à des protéines ribosomiques sont constitués de deux composants complémentaires, partiellement redondants : le complexe associé aux polypeptides naissants (NAC) et la tri-chaperonne SSB-RAC (stress 70 B– ribosome-associated complex). Le NAC se lie aux polypeptides naissants très rapidement afin de les protéger de la dégradation et d'interactions involontaires (S. Wang, Sakai, & Wiedmann, 1995). Le tri-chaperon composé de la ATP-dépendant HSP70 SSB et de son régulateur le complexe RAC, assure le repliement du néo polypeptide (P. Huang et al., 2005; Leidig et al., 2013 ; Willmund et al., 2013). En plus de leur rôle protecteur de l'agrégation des protéines ribosomiques, les chaperons des RP sont impliqués dans le repliement des protéines longues (Koplin et al., 2010). En effet, l'inactivation simultanée du NAC et de HSP70-RAC entraîne une agrégation de 22 des 30 protéines de la sous-unité 40S du ribosome et de 30 des 46 protéines de la sous-unité 60S.

A ce jour, 10 de ces chaperons dédiés aux RP ont été caractérisés chez la levure (tableau 6) : Rrb1, Sqt1, Acl4, Bcp1, Syo1, Tsr4, Yar1, Tsr2, Fap7 et Nap1. Les cinq premiers chaperons interagissent avec une protéine de la grande sous-unité du ribosome, respectivement RPL3 (Iouk et al., 2001), RPL10 (West et al., 2005), RPL4 (Pillet et al., 2015), RPL23 (Ting et al., 2017), RPL5 et RPL11 pour Syo1 (Calvino FR, et al., 2015). Les autres sont des chaperons

dédiés à des RP de la petite sous-unité du ribosome : RPS6 (Black, Musalgaonkar, & Johnson, 2019; Rössler et al., 2019), RPS3 (Koch et al., 2012), RPS26 (Schütz et al., 2018) et le complexe RPS14/RPS26 pour Fap7 (Peña et al., 2016). Le chaperon Nap1 a la particularité de se lier à la fois à une RP de la petite sous-unité : RPS6 et à deux RP de la grande sous-unité : RPL39 et RPL42 (Rössler et al., 2019). La plupart de ces protéines chaperons se lient à leur cible dans le cytoplasme. A l'exception de la protéine RPL10 qui est incorporée dans des sous-unités 60S quasi matures dans le cytoplasme (Kressler et al., 2012) toutes les RP interagissant avec un chaperon dédié s'assemblent au 60S dans le noyau (Iouk et al., 2001; Pillet et al., 2015; Schütz et al., 2014; Stelter et al., 2015). Chacune de ces protéines ont donc une fonction différente (figure 38). De plus, ces chaperons de protéines ribosomiques se retrouvent principalement en complexe avec leurs partenaires de liaison. Elles peuvent se lier de manière transitoire ou pas du tout aux particules pré-ribosomiques.



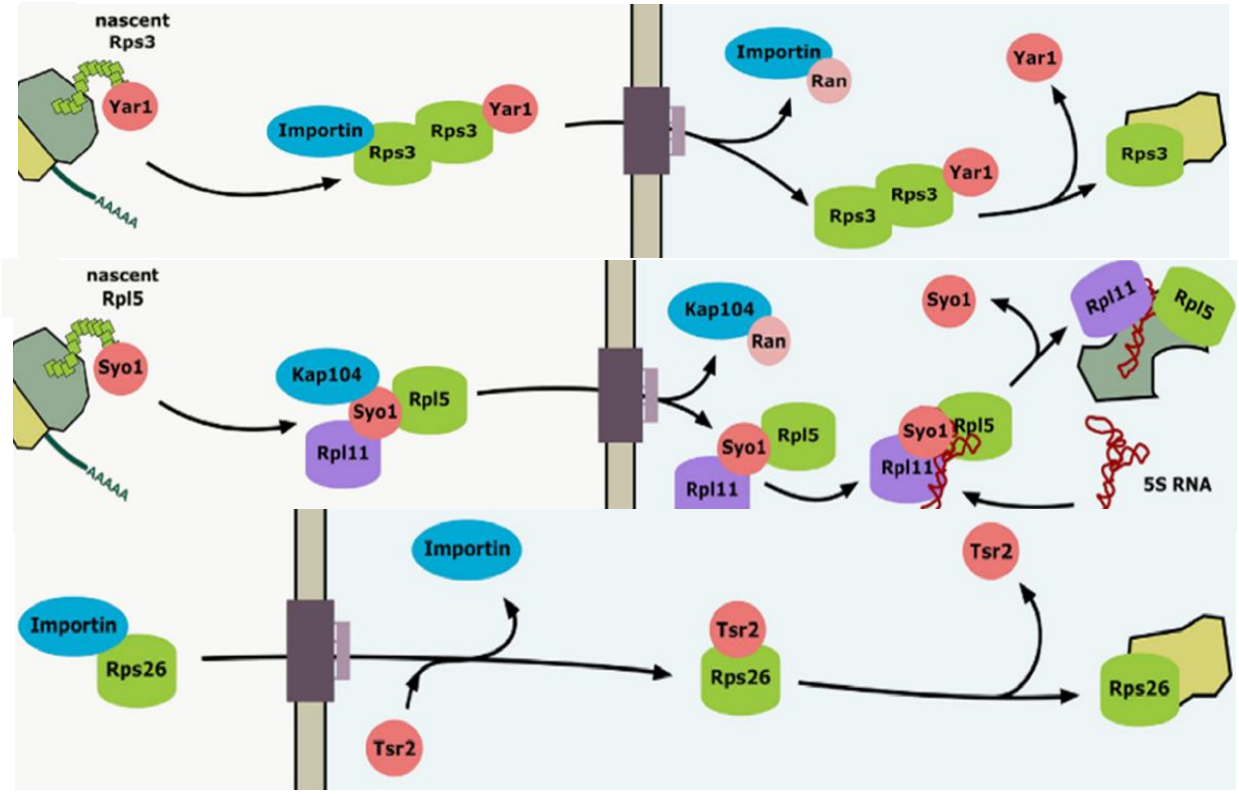


Figure 38 : Schématisation des différents rôles fonctionnels des chaperons dédiés aux RP. La Sqt1 lie la région N-terminale de la protéine RPL10 et facilite son incorporation dans les sous-unités pré-60S au niveau du cytoplasme. Acl4 reconnaît la partie C-terminale de la boucle interne de la RPL4 et l'accompagne dans le noyau. L'association se dissocie lors de l'incorporation de la RPL4 au sein de la sous-unité 60S. Rrb1 lie la RPL3 et l'accompagne sur son site d'assemblage pré-60S dans le noyau. Yar1 reconnait la RPS3 qui se dimérise. Une fois le complexe RPS3-RPS3-Yar1 importé dans le noyau, le dimère RPS3 se dissocie, s'incorpore dans une particule pré-40S et Yar1 est libéré. La Syo1 capture RPL5 et lie RPL11. La Kap104 se lie alors à Syo1 et assure la médiation de l'import nucléaire du complexe. Après le recrutement de l'ARNr 5S dans le complexe Syo1-RPL5-RPL11 au niveau du noyau, la RNP 5S est incorporée dans les sous-unités pré-60S et Syo1 est libéré. La TSR2 s'associe à RPS26 après son import nucléaire, dissociant ainsi le complexe RPS26-importine d'une manière indépendante de RanGTP et guidant son transfert en toute sécurité vers le pré-ribosome 90S (Pillet et al., 2017).

Les protéines ribosomiques étant hautement conservées au cours de l'évolution, l'existence de mécanismes de protection similaires semble possible entre la levure et l'humain, les deux étant des eucaryotes. Les protéines homologues humaines existent pour la plupart des protéines identifiées jusqu'ici chez la levure (tableau 6). Il est donc probable qu'elles fonctionnent comme des chaperons dédiés à des RP. Dans notre projet, nous nous sommes intéressés principalement à la protéine HEATR3 (HEAT repeat-containing protein 3), l'orthologue humaine de la protéine Syo1.

Dedicated chaperone	Tsr2	Yar1	Acl4	Rrb1	Sqt1	Syo1
Associated r-protein	Rps26 (eS26)	Rps3 (uS3)	Rpl4 (uL4)	Rpl3 (uL3)	Rpl10 (uL16)	Rpl5 (uL18) Rpl11 (uL5)
Phenotype of null mutant	Strong slow growth	Strong slow growth at low temperature	Strong slow growth	Lethal	Lethal	Slow growth at low temperature
Steady-state localization	Nuclear	Mainly cytoplasmic	Nuclear	Nucle(ol)ar	Cytoplasmic	Mainly nuclear
Structure/fold	Unknown	Ankyrin repeats	TPR repeats	Predicted WD-repeat β-propeller	8-bladed WD-repeat β-propeller	ARM and HEAT repeats
Main binding region on r-protein (amino acids)	Unknown	N-terminus Rps3 (14-29)	Internal loop Rpl4 (72-114)	N-terminus Rpl3 (1-15)	N-terminus Rpl10 (2-13)	Rpl5 N-terminus (2-20) Rpl11: β-sheet (16-131)
Main binding region on chaperone	Unknown	Cradle formed by ankyrin-repeat core	TPR repeats 4-6	Unknown	Negatively charged top surface of β-propeller	Rpl5: HEAT domain Rpl11: helical segment at the end of acidic loop
Co-translational binding	Not tested	Yes	Yes	Yes	Yes	Rpl5: yes; Rpl11: no
Human orthologs	hTSR2	No obvious ortholog; hRPS3 interacts with IκBα	No obvious ortholog	GRWD1 (Glutamate-Rich WD-Repeat Containing 1)	AAMP (Angio-Associated Migratory Cell *Protein*)	HEATR3 (HEAT repeat-containing protein 3)

Tableau 6 : Caractérisation de quelques chaperons dédiés aux RP (de Pillet et al., 2016).

B. Une protéine chaperon liée au transport et à l'assemblage de la protéine ribosomique : HEATR3

1. Structure et expression de HEATR3

Le gène codant la protéine HEATR3 est situé sur le chromosome 16 et code pour une protéine de 680 acides aminés pour une masse moléculaire d'environ 75 kDa. Syo1 (ou HEATR3 chez l'humain) est un adaptateur d'import et une protéine chaperon se distinguant des autres par sa liaison à deux RP simultanément. A l'état d'équilibre, la symportine Soy1 se

localise principalement dans le noyau. Elle a une forme générale solénoïde, typique des récepteurs de transport nucléaire. Elle contient dans sa région N-terminale un domaine ARM composé de quatre répétitions ARM du résidu 65 au résidu 260 et dans sa région C-terminale un domaine HEAT composé de six répétitions HEAT (huntingtin, factor d'élongation 3, une sous-unité A de PP2A et TOR) des résidus 274 au résidus 675 (figure 39) (Kressler et al., 2012). Des analyses structurelles chez la *Chaetomium thermophilum* ont mis en évidence que la surface interne du domaine HEAT recevait les acides aminés 2 à 20 de la région N-terminale de RPL5. Cette liaison entraîne un léger réarrangement conformationnel des domaines ARM et HEAT de la protéine Syo1. Il semble que l'interaction entre la région N-terminale de RPL5 et le domaine HEAT de Syo1 « ouvre » la structure solénoïde du chaperon. Pour RPL11, l'interaction se réalise entre les acides aminés 16 à 131 en N-terminal de la RP et Syo1 au niveau d'un segment hélicoïdal (HS) reliant les HEAT1 et HEAT2 (Kressler et al., 2012 ; Calviño et al., 2015a) (Figure 39).

Une fois le complexe Syo1-RPL5-RPL11 formé, il peut se lier à l'ARNr 5S conduisant à des réarrangements structurels. Dans ce cas précis, l'ARNr 5S est exporté vers le cytoplasme pour y être stocké soit avec la protéine ribosomique L5 (5S RNP) soit avec le facteur de transcription IIIA (7S RNP) (Ciganda & Williams, 2011). Cela peut suggérer la formation d'un pré-5S RNP contenant Syo1. De plus, le chaperon Syo1 se lie à RPL11 sur la même surface que celle de l'hélice H84 de l'ARNr 25S. Soy1 semble donc protéger ce site de liaison puis il est surpassé par H84 qui prend le relais. Ce site peut correspondre à un site d'accueil lors du recrutement de la 5S RNP (constituée de RPL5, RPL11 et de l'ARNr 5S) au pré-60S du ribosome. D'autres études ont montré que les deux facteurs de biogenèse Rpf2 et Rrs1 pouvaient former un complexe stable avec RPL5, RPL11 et l'ARNr 5S. Il semblerait que ces deux facteurs puissent permettre le recrutement de la 5S RNP au niveau des particules précoces de la pré-60S (J. Zhang et al., 2007). Toutefois, d'autres études sont nécessaires pour déterminer la participation ou non, avec Syo1, des facteurs Rpf2 et Rrs1 dans l'assemblage de la 5S RNP.

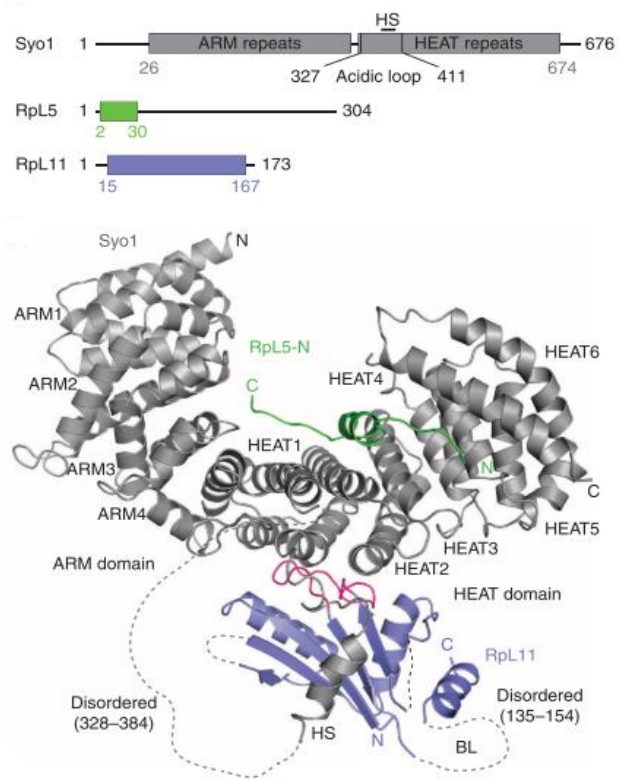


Figure 39 : Structure de Syo1 (HEATR3 chez l'humain) et du complexe Syo1-RPL5-RPL11. Domaine structural de Syo1 (75kDa), RPL5 (35 kDa) et RPL11 (25 kDa). Structure de Syo1 (en gris) dans le complexe RPL5 N-terminal (en vert) et RPL11 (en bleu) (Calviño et al., 2015a).

2. Les principales fonctions connues de la protéines HEATR3

Le chaperon Syo1 joue un double rôle dans la synthèse des ribosomes. Elle facilite l'association des protéines RPL5 et RPL11 à la sous-unité pré-60S et elle est une plateforme d'assemblage pour la 5S RNP.

Soy1 se lie à la protéine ribosomique RPL5 durant sa traduction. En effet, Syo1 interagit avec RPL5 dès les premiers acides aminés synthétisés en N-terminal. En revanche, la liaison entre Soy1 et RPL11 est postérieure à la traduction puisque leur interaction nécessite le repliement en structure tertiaire. En effet, le site de liaison de Syo1 sur RPL11 se localise à la surface d'un feuillet β. En plus d'accompagner les deux protéines ribosomiques dans le noyau, Soy1 joue un rôle actif dans leur import nucléaire. En effet, elle fonctionne tel un adaptateur

d'import qui contient dans sa région N-terminale un domaine PY-NLS capable de reconnaître l'importine Kap104 (Kressler et al., 2012) (figure 40).

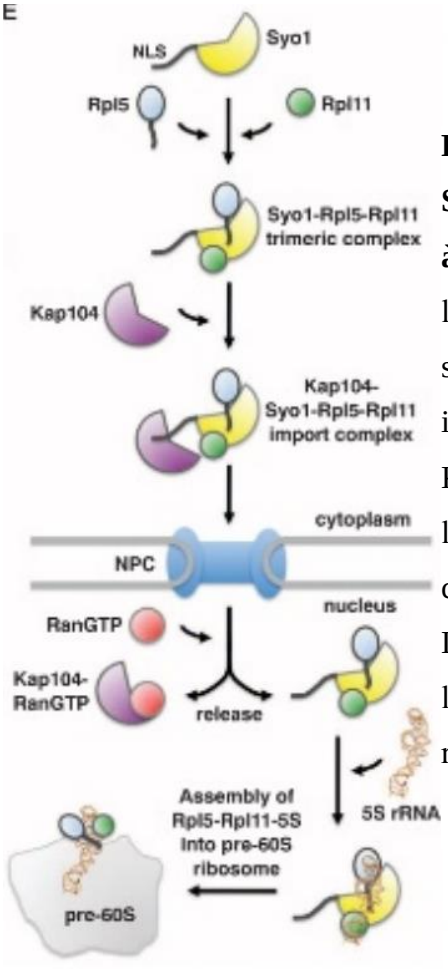


Figure 40 : Schématisation de l'import du complexe Syo1-RPL5-RPL11 au sein du noyau via Kap104 et se lie à l'ARNr 5S. L'adaptateur de transport Syo1 synchronise l'import nucléaire de RPL5 et RPL11. Syo1 interagit simultanément avec les deux RPs dans le cytoplasme. Cette interaction permet la formation du complexe tétramère Kap104-Syo1-RPL5-RPL11. Une fois dans le noyau, la liaison d'un RanGTP à Kap104 favorise la libération du complexe Syo1-RPL5-RPL11 qui va recruter l'ARNr 5S. Les ARNr des deux RPs et de l'ARNr 5S sont incorporés à l'aide de facteurs d'assemblage dans des particules ribosomiques de la 60S (d'après Kessler et al., 2012).

Lors de son arrivée au nucléoplasme, Syo1 se délie à Kap104 via une liaison à un RanGTP promouvant ainsi la libération du complexe Syo1-RPL5-RPL11 dans le noyau. À la suite de cela, le complexe peut s'associer à l'ARNr 5S. La liaison de l'ARNr 5S aux protéines RPL5 et RPL11 induit des réarrangements indiquant la formation d'un pré-RNP 5S. Une étude a confirmé que Syo1 sert également de plate-forme d'assemblage pour la RNP 5S et propose un modèle pour la biogenèse de la RNP 5S (Figure 40). Ainsi d'après ce modèle, Syo1 lie les deux protéines ribosomiques sur les côtés opposés sans interaction entre RPL5 et RPL11. La région N-terminale de la RPL5 est logée dans une cavité de Syo1 alors que RPL11 est recruté via le segment HS. L'ARNr 5S peut interagir avec le complexe ternaire Syo1-RPL5-RPL11

(figure41). L'ARNr 5S semble bloqué par les régions N et le C-terminales de RPL5. Les données obtenues suggèrent un déplacement de RPL5 par rapport à l'extrémité N-terminale de Syo1 et un rapprochement entre les deux régions C-terminales. RPL11 se déplace et se lie à l'ARNr 5S. Un pré-RNP 5S est formé en présence de Syo1 représentant ainsi un intermédiaire précoce dans la biogenèse de la RNP 5S. A ce jour, la destination de cet intermédiaire reste encore inconnue. Il pourrait être dirigé vers la sous-unité ribosomique pré-60S. L'intervention de facteurs tels que Rpf2 et Rrs1 et/ou des réarrangements pourraient avoir lieu et être nécessaire à sa maturation. Dans la préparticule pré-60S, RPL11 est déjà lié à la H84 de l'ARNr 25S de la même manière que dans la sous-unité 60S. Syo1 protège spécifiquement le site d'interaction de H84 sur RPL11. Ces 2 protéines sont en concurrence pour se lier à RPL11. La liaison de H84 à la RP ne libère pas le chaperon Syo1 de la pré-RNP5S (Calviño et al., 2015b).

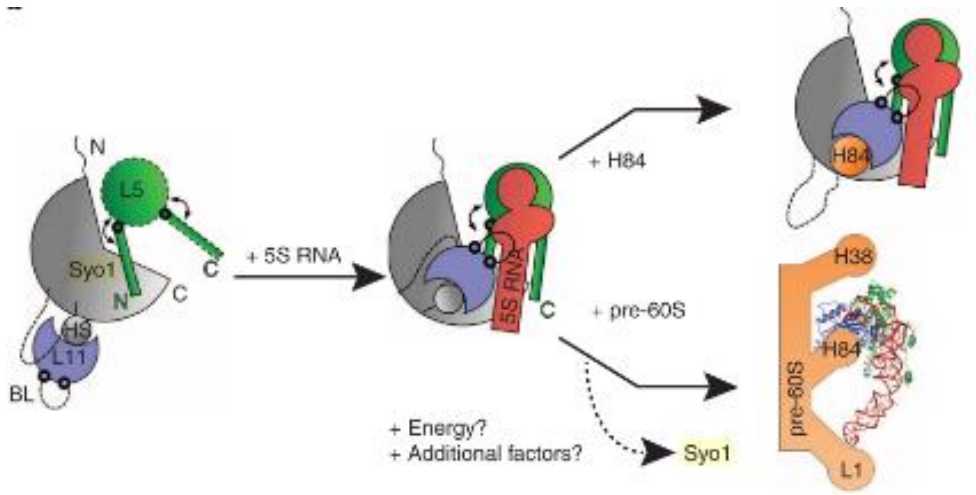


Figure 41: Modélisation du rôle de Syo1 dans l'assemblage de la RNP 5S (d'après Calvino et al., 2015).

Le chaperon Syo1 non complexé possède la capacité d'interagir avec les nucléoporines via leurs répétitions phénylalanine glycine. Il peut ainsi transloquer à travers les pores nucléaires et retourner au cytoplasme.

En 2013, une étude a montré un autre rôle de la protéine HEATR3 chez l'Homme. L'étude de l'expression d'HEATR3 a montré un rôle positif dans la signalisation de NF-κB médiée par NOD2, une protéine impliquée dans la réponse immunitaire (W. Zhang et al., 2013). Le gène *HEATR3* est fortement exprimé dans les cellules de l'immunité innée (Maouche et al.,

2008). La protéine HEATR3 est un régulateur positif de NOD2 qui va stimuler NF-κB. Cette étude montre par ailleurs qu'une mutation faux-sens sur le gène *HEATR3* est associée au développement de la maladie de Crohn.

Compte tenu du rôle de Soy1 mais également de ceux des autres chaperons dédiés à la protection des protéines ribosomiques, il n'est pas étonnant d'observer des phénotypes similaires entre des chaperons dédiés mutés et leur protéines cibles quand celles-ci sont mutées. La plupart des protéines ribosomiques nécessitant un chaperon dédié ont une implication dans le développement de pathologies humaines.

Chapitre 4 : De nouvelle implication : un érythroblastopénie congénitale mais non responsable d'une ribosomopathie

I. Généralité sur le gène CECR1

A. Structure et expression de la protéine

L'adénosine appartient à une classe de petites molécules jouant un rôle important dans la régulation de nombreux processus physiologiques tels que le contrôle du sommeil ou la modulation du système immunitaire (Fredholm, 2007; Haskó et al., 2008; Linden & Cekic, 2012). Normalement présente en faible concentration dans l'organisme ; l'adénosine peut s'accumuler rapidement lors d'un dommage tissulaire dans l'espace extracellulaire (Eltzschig, Sitkovsky, & Robson, 2013). L'adénosine peut se lier et activer ses récepteurs exprimés par une grande majorité des cellules de l'organisme telles que les cellules du système immunitaire, cardiovasculaire et nerveux (Burnstock, 2008; Haskó et al., 2008). Deux enzymes différentes mais ayant une activité d'adénosine désaminase identique sont présentes chez l'Homme : ADA1 (Adénosine Désaminase 1) et ADA2 (Adénosine Désaminase 2). La protéine ADA1 codée par le gène *ADA1* est une enzyme intracellulaire. La protéine ADA2 codée par le gène *CECR1*, appartient à la famille des facteurs de croissance ADGF (Adenosine Deaminase Growth Factors) (A. V. Zavialov & Engström, 2005a), sécrétée par les cellules myéloïdes et possède une activité extracellulaire (A. V. Zavialov et al., 2010).

Il existe d'importantes différences entre les 2 protéines ADAs à la fois dans l'agencement de leur domaine catalytique et dans leurs architectures générales (Zavialov et al., 2010). La protéine ADA2 présente un domaine catalytique ouvert et une séquence N-terminale nécessaire à la dimérisation de la protéine et à son interaction avec les protéoglycanes (Zavialov & Engström, 2005b).

B. Les fonctions de ADA2

ADA1 régule la concentration en adénosine intracellulaire et peut se lier soit au CD26 (dipeptidyl peptidase IV), soit aux récepteurs à adénosine A1, A2A, A2B exprimés à la surface

des cellules immunitaire, soit de manière simultanée aux cellules dendritiques et aux cellules T (Franco et al., 2007). Une récente étude a montré que les deux ADAs se liaient à un sous-ensemble de cellules immunitaires régulant ainsi leurs fonctions différemment (Kaljas et al., 2017). Alors que ADA1 se lie aux cellules T et aux NK exprimant le récepteur CD26, ADA2 se lie aux neutrophiles, aux monocytes, aux cellules B et T régulateurs et aux NK qui n'expriment pas CD26 à leur surface. De plus, il a été démontré que ADA2 joue un rôle dans l'embryogenèse (Iijima et al., 2008) et dans la différenciation cellulaire des monocytes en macrophages et l'homéostasie des cellules immunitaires (Q. Zhou et al., 2014). En effet, ADA2 stimule la prolifération des lymphocytes T helper et des macrophages de manière indépendante de son activité catalytique (Zavialov et al., 2010).

II. Déficit en ADA2

Le déficit en adénosine désaminase 2 (DADA2) est considéré comme une maladie rare dont la prévalence est plus élevée au sein des populations à consanguinité élevée. Les patientes présentant un déficit en ADA2 – pouvant être corrigé par une greffe de CSH (Van Eyck et al., 2015; van Montfrans, Zavialov, & Zhou, 2014) - présente des symptômes différent de ceux possédant un déficit en ADA1. Bien que l'absence de l'une des deux protéines conduise à un dérèglement de la fonction immunitaire, l'absence d'une de ces enzymes fonctionnelles n'est point compensée par la présence de l'autre. Le DADA2 est d'une trouble auto-inflammatoire systémique complexe dans lequel plusieurs systèmes de l'organisme peuvent être affectés. Le DADA2 est associé à une activité enzymatique de la protéine ADA2 faible (<5% de la normale). Le DADA2 est causé par une modification bi-allélique du gène *ADA2* (appelé également *CECR1*). Un DADA2 présente des signes cliniques et biologiques de maladie auto-inflammatoire systémique caractérisée par une vascularite, une dysrégulation de la fonction immunitaire et des anomalies hématologiques (Hashem et al., 2017; P. Y. Lee, 2018; Meyts & Aksentijevich, 2018). D'autres signes cliniques incluent une atteinte neurologique, gastro-intestinale et musculo-squelettique. Les caractéristiques inflammatoires comprennent des fièvres intermittentes, des manifestations cutanées (Caorsi et al., 2016; Santiago et al., 2015; Skrabl-Baumgartner et al., 2017) et des atteintes musculo-squelettiques (myalgie, myosite, arthrite) (Meyts & Aksentijevich, 2018; Sahin et al., 2019). La dérégulation immunitaire peut conduire à une immunodéficience (Q. Zhou et al., 2014), une maladie lymphoproliferative ou

une auto-immunité de gravité variable. Récemment, des mutations du gène *ADA2* ont été identifiées chez des patients possédant un déficit en ADA2 accompagné d'une neutropénie, une lymphopénie et un défaut de médullaire (Ghurye et al., 2019). Environ 20% des patients souffrent d'infections virales et/ou bactériennes. Les infections bactériennes touchent principalement les voies respiratoires supérieures et inférieures, le tractus gastro-intestinal et les voies urinaires. Les patients peuvent contracter des infections récurrentes d'herpès ou un zona, des verrues cutanées causées par le virus du papilloma humain (Arts et al., 2018; Ghurye et al., 2019). Les vascularites débutent souvent avant l'âge de 10 ans et peuvent se manifester par des accidents vasculo-cérébraux et/ou des ischémies précoces (Bulut et al., 2019), et une hypertension. Une atteinte grave peut mener à des déficits neurologiques centraux progressifs (ataxie, déficience cognitive, lésion ischémique du rein, de l'intestin et/ou des doigts) (Springer et al., 2018). Du côté hématologique, un dérèglement survient généralement de manière précoce bien que dans de rares cas, l'insuffisance médullaire puisse apparaître après la cinquantaine. Une biopsie de la moelle osseuse révèle souvent un défaut de différenciation cellulaire. Ainsi les complications hématopoïétiques se manifestent par une diminution du nombre de leucocytes, des plaquettes et des érythrocytes (pancytopénie) mais peuvent donner lieu seulement à une hypoplasie pure des globules rouges (érythroblastopénie) semblable à l'anémie de Blackfan-Diamond. En 2018, des patients des différents registres internationaux de patients d'ABD ont été identifiés comme porteur de mutations biallélіques sur le gène *CECR1* (Claassen et al., 2018). Dans l'observatoire français des patients atteints d'ABD (OFABD), deux patients ont été retrouvés mutés sur ce gène. Nous avons pu commencer l'étude de l'érythropoïèse d'un de ces patients, présentés en annexe compte tenu de la place occupée par ces patients par rapport aux patients ABD classiques et ABD-like. En effet, le débat de les inclure ou non dans les syndromes ABD n'est toujours pas tranché au sein de la communauté scientifique et médicale de l'ABD.

PROJET DE RECHERCHE

Chapitre 5 : Projet de recherche

Actuellement 20 gènes de protéines ribosomiques ont été identifiés dans l'anémie de Blackfan-Diamond. Elles sont retrouvées chez 70 à 80% des patients faisant de l'ABD la première ribosomopathie décrite. Le défaut en un gène RP conduit à un défaut de maturation en ARN ribosomique secondaire à l'haplo-insuffisance en une protéine ribosomique responsable d'anomalies de la biogenèse du ribosome. Ce défaut de maturation génère un stress nucléolaire et la stabilisation de la protéine p53 responsable en partie de l'érythroblastopénie via un arrêt du cycle cellulaire et une induction de l'apoptose. De plus, notre équipe a montré que l'expression de la protéine HSP70 est significativement diminuée suite à sa dégradation par le protéasome après son ubiquitinylation dans les cellules présentant une haplo-insuffisance en RPL5 ou RPL11. Le défaut de HSP70 survient dès le stade BFU-e. Lors de sa surexpression, HSP70 induit une diminution de la protéine p53 ce qui réduit l'apoptose et améliore la prolifération et la différenciation des cellules érythroïdes. Cependant, cette observation n'a pas été rapportée dans le cas d'une haplo-insuffisance en RPS19.

Après s'être intéressée aux mécanismes physiopathologiques responsables de la survenue de la maladie et notamment son tropisme érythroïde, notre équipe est revenue à une approche « gène candidat ». En effet, suite au génotypage de la cohorte française des patients atteints d'ABD, en séquençage NGS ciblé et après une réalisation d'un CGH customisée, 20% des patients restent sans génotype caractérisé.

L'objectif principal de ce travail de thèse porte sur l'identification de gènes candidats dans l'anémie de Blackfan-Diamond ainsi que leurs caractérisations fonctionnelles.

MATERIELS ET METHODES

Chapitre 6 : Matériels et méthodes

I. Cultures cellulaires

A. Les cellules primaires CD34+

Des cellules primaires $CD34^+$ issues de sang périphérique ou de moelle osseuse de patients atteints d'ABD et de témoins sains ont été isolées à partir de cellules sanguines mononucléés (PBMC) obtenus par gradient de ficoll. Les échantillons de patients proviennent des différents centres hospitaliers de France ou Européen (Allemagne, Pays Bas). Les prélèvements de patients sont obtenus après signature de consentement. A la réception des échantillons, les cellules sont purifiées par un marquage de billes magnétiques du kit $CD34^+$ MicroBeads isolation (Miltenyi Biotec, Paris, France). A la suite de plusieurs lavages avec du tampon phosphate salin (PBS), les cellules sont mises en culture en raison de 100 000 cellules/ml dans un milieu de culture selon le protocole Hu et al., Blood 2013. Les cellules sont dénombrées via un marquage au bleu de trypan. Les diverses étapes de la différenciation érythroïde ont été caractérisées par l'équipe de N. Mohandas (New York Blood Center, NY, USA). Le protocole de culture est divisé en trois étapes : i) J0-J6 ii) J6-J10 iii) J10-J14. Le milieu est composé de IMDM avec glutamax (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), de 3% sérum humain de type AB (Sigma-Aldrich, Lyon, France), de 2% plasma humain (human peripheral blood plasma, Stemcell Technologies, Sheffield, United Kingdom), de 10µg/ml d'insuline (recombinant human insulin, Sigma-Aldrich, Lyon, France), de 3UI/ml d'héparine (Sigma-Aldrich, Lyon, France), de 200µg/ml de J0 à J10 puis de 1 mg/ml entre J10 et J14 d'holotransferrine (Sigma-Aldrich, Lyon, France), de 10ng/ml de hSCF au cours des dix premiers jours (Miltenyi Biotec, Paris, France), de 1 ng/ml d'IL-3 humaine recombinante au cours des six premiers jours de culture (Stemcell Technologies, Sheffield, United Kingdom), et de 1X pénicilline-streptomycine et d'EPO (Life Technologies, Carlsbad, USA). La concentration d'EPO évolue au cours de la différenciation avec de J0 à J6, 3 UI/ml ajouté au milieu de culture, de J6 à J10, 1 UI/ml et de J10 à J14, 0,1UI/ml. Ce protocole permet une synchronisation des cellules aux stades BFU-e et CFU-e aux alentours du cinquième jour de culture cellulaire (CFU-e).

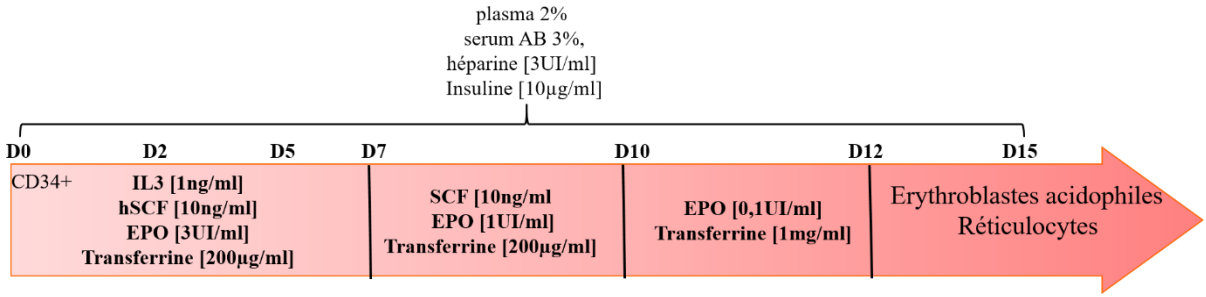


Figure 42: Protocole de culture cellulaire selon Hu et al., 2013.

B. Lignées lymphoblastoïdes EBV issues de patients ou de témoins sains

Les échantillons de sang des patients atteints d'ABD ainsi que les témoins sains sont amenés au centre de ressources biologiques basé à l'hôpital Cochin (Pari)s pour être immortalisé via le virus EBV (virus Epstein-Barr). Les cellules lymphoblastoïdes infectées EBV sont mises en culture dans un milieu RPMI supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF), 1% pénicilline streptomycine. Les cellules sont mises en cultures à raison de 500 000 cellules/ml.

II. Cytométrie de flux

A. Etude de la différenciation érythroïde

La technique de cytométrie en flux multiparamétrique (CMF) est utilisée pour étudier la différenciation érythroïde via l'apparition des marqueurs cellulaires des cellules $CD34^+$ issues de patients ABD (figure 43). Pour ce faire, nous pratiquons une analyse à différents moments de la différentiation : au stade proérythroblaste (D7), au stade érythroblaste polychromatophile (D10), au stade érythroblaste acidophile (D12) et au stade réticulocyte (D15) quand cela est possible. Des échantillons de 25 000 à 50 0000 cellules sont utilisées pour réaliser les expériences selon la pousse cellulaire. D'un côté, les cellules sont marquées avec des anticorps anti-CD34 couplés à la phycoérythrine (PE) (Becton Dickinson, San Jose, USA), anti-CD36 couplés à l'allophycocyanine (APC) (Becton Dickinson, San José, USA) et anti-IL3-R (CD123) couplés à la phycoérythrine-cyanine 7 (PeCy7) (eBioscience, Paris, France) pour

étudier leur degré d'immaturité. D'un autre côté, les cellules sont marquées avec des anticorps anti-BAND3 couplés à la phycoérythrine (PE) (Becton Dickinson, San Jose, USA), anti-alpha4-intégrine (CD49d) couplés à l'allophycocyanine (APC) et anti-glycophorine (GPA ou CD235a) couplés à la phycoérythrine-cyanine 7 (PeCy7) pour étudier leur stade de maturité.

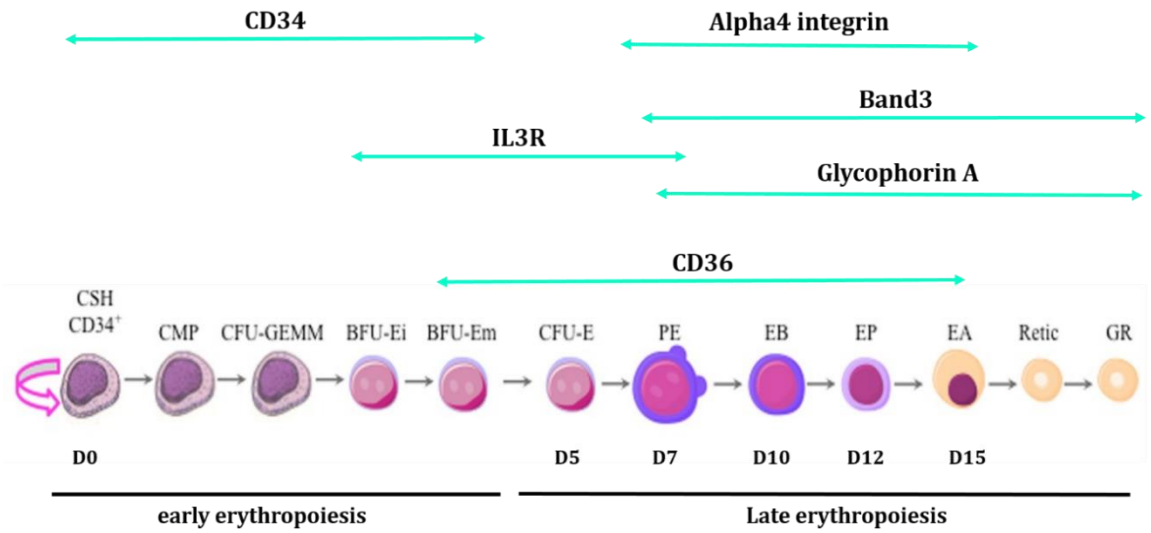


Figure 43: Schématisation de l'apparition des différents marqueurs cellulaires au cours de la différenciation érythroïde.

B. Etude de l'apoptose et de la viabilité cellulaire

Un marqueur de viabilité – Zombie NIR (Biolegend, San Diego, USA) ou 7-aminoactinomycine (7-AAD) (Biolegend, San Diego, USA) - a été utilisé pour chacune des expériences pour s'assurer de la viabilité des cellules définies et utilisées pour les analyses. Pour déterminer et différencier l'apoptose de la nécrose, les cellules ont été incubées avec de l'Annexine V couplée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et de l'iodure de propidium issus du kit (Biolegend, San Diego, USA) durant quinze minutes avant d'être analysées au CMF.

C. Etude du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est étudié chez le patient et le témoin aux différents jours de la différenciation érythroïde. Des échantillons de 10 000 cellules sont incubées au moins 1h à 4°C

avec 150 µl de SVF pur froid et 450 µl d'éthanol à 70% froid déposé goutte à goutte. Pour effectuer l'analyse au FACS, les échantillons sont lavés 2 fois avec du PBS puis ils sont incubés avec de l'iodure de propidium à 1mg/ml.

III. Western blot

Chaque culot cellulaire de patient contenant entre 25 000 et 50 000 cellules a été lysé dans du Laemmli buffer 2X puis soniqué (3 fois 15 secondes) en étant toujours placé dans de la glace. Les cellules sont dénaturées pendant 5 minutes à 95°C en présence d'un tampon dénaturant. Puis les protéines sont déposées sur un gel gradient 4-12% TGX stain-free (BIO-RAD) pour une électrophorèse dans un tampon MOPS SDS running Buffer (Life technologie, Carlsbad, USA) se déroulant à 60 Volts (V) durant 15 minutes pour la phase stacking du gel puis 120V pour la phase running pendant 90 minutes. Suite à cela, après activation du marquage Stain Free du gel, les protéines sont transférées au cours d'un transfert semi-sec sur une membrane de nitrocellulose (Biorad, Hercules, USA) pour une durée de 10 min. Le niveau des protéines transférées est évalué par l'appareil Chemidoc (Biorad, Hercules, USA) ou par l'utilisation d'une solution de rouge ponceau avec laquelle la membrane est incubée 5 minutes à température ambiante. Après plusieurs lavages de 10 minutes avec une solution de Tris Buffer Saline (TBS) (Interchim) contenant 1% de tween (TBST 0,1%) (Twen20) (Sigma-Aldrich, Lyon, France), la membrane est saturée une heure à température ambiante avec, selon l'anticorps primaire soit du lait écrémé soit de la BSA repris dans du TBST 0,1% à une concentration variant de 3 à 5%. L'immuno-marquage avec les anticorps primaires dont la concentration varie de 1 : 500 à 1 : 3000 est réalisée sur la nuit à 4°C (tableau 7). Après plusieurs lavages avec du TBS tween 0.1%, les membranes sont incubées 1h à température ambiante avec des anticorps secondaires couplés à la peroxidase de raifort (HRP) : chèvre anti-lapin ou mouton anti-mouse. Après plusieurs lavages, les protéines sont révélées à l'aide d'un substrat luminescent de la HRP ECL (GE Healthcare).

Protéine	Taille Bande	Référence	Espèce	Concentration
PARP totale et clivée	89 et 116	Cell signaling (9542)	Lapin	1/1000e 5% lait
RPL5	34	Abcam (157099)	Lapin	1/2000e BSA 0,5%
RPL9	22	Abcam (102011)	Lapin	1/1000e BSA 0,5%
Actine	43	Invitrogen (BA3R)	Lapin	1/1000e 5% lait
Bcl-xL	30	Cell signaling (2764)	Lapin	1/1000e 5% lait
HSP70/72	70	Enzo (C92F3A-5)	Souris	1/1000e 5% lait
RPS19	16	Abcam (57643)	Souris	1/1000e 5% lait
HEATR3		Abcam(221085)		1/1000e 5% lait
p21	21	Cell signaling (12D1)	Lapin	1/500e BSA 5%
Caspase 3	35	Cell signaling (9662)	Lapin	1/1000e 5% lait
Anti-souris	-	Cell signaling	Mouton	1/10 000e 5% lait
Anti-lapin	-	Cell signaling	Chèvre	1/10 000e 5% lait

Tableau 7: Références des anticorps primaires et secondaires utilisés pour les Western Blot.

IV. La transcription inverse et PCR quantitative

Les ARNs totaux d'échantillons de 25 000 à 50 000 cellules issues de patients atteints d'ABD ou de témoins ont été extraits en utilisant du trizol RNA-PLUS™ (MP Biomedicines, Illkirch, France) et du chloroforme. Après quantification au Nanodrop ((Nanodrop Thermo Scientific, Wilmington, USA), 100 ng à 1µg d'ARN ont été utilisés pour la transcription inverse réalisée à l'aide du kit Superscript™ Reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA) selon le protocole du fournisseur. La PCR quantitative a été réalisé à l'aide du kit TaqMan™ Gene expression Master Mix (Thermo Scientific, Wilmington, USA) sur un thermocycleur. Des amorces spécifiques de chaque gène ont été designées et utilisées (tableau 8).

Gènes cibles	Amorces 5'-> 3'
RPL5	GCTGTGGATGGAGGCTTGTC ATCCCTCACAGTACCAAACGATTCCCTGG
RPS19	TGCCGCGCTGTGGAA CGACCAAATCCGTTGACTCC
Actine β	GGGTGTAACGCAACTAAGTC GCAGATGTGGATCAGCAAG
GAPDH	CCTCTTCGACAGTCAGCCG CGACCAAATCCGTTGACTCC
Bax	GGTTGTCGCCCTTTTCTACTTTG CAGTTCCGGCACCTTGGT
HSP70	CGGCGGCATCGAGACTAT AATACGATTCTTAGGACCAAAA
HEATR3	AGAGGCAGAGGGGAGAAAAC CTGACAAGGAACTGAGAGAGAC
HSPA14	GCTAGAGCTGCTGGATTTATTG TGACGCTGAGAGATAAGGATG
p21	CCTTGTGGAGCCGGAGCT TTGCTGCCGCATGGG
p53	TTTGCGTGTGGAGTATTTGGAT TGTAGTGGATGGTGGTACAGTCAGA

Tableau 8: Séquences des amorces de RT-qPCR quantitative (Taqman).

Les analyses des différents résultats ont été réalisées en utilisant la méthode de calcul ΔΔCt. Afin de réaliser une gamme de concentration relative 1/5, 1/10, 1/50 et de déterminer l'efficacité de la PCR quantitative pour chaque amorce, les échantillons d'ADNc de patients et de témoin ont été mélangés au ratio 1 :1. Les points de chaque échantillon ont été déposés en triplicata sur une plaque 96 puits. Des puits contenant de l'eau ultra-pure ont servi de contrôle pour vérifier l'absence de contamination.

V. Test statistiques

Les statistiques (moyennes et écart-types) ont été réalisées entre les valeurs obtenues de deux à quatre expériences différentes (études prolifération) ou une triplication d'une même expérience (analyse RT-qPCR). Les tests student t ont permis de calculer les significativités entre les différentes conditions (contrôle et les autres). Les tests ont été faits via l'utilisation du logiciel GraphPad Prism 6.

RESULTATS

Chapitre 7 : Résultats

Afin de rechercher de nouveaux gènes candidats pour l'ABD, une analyse moléculaire par séquençage d'exomes a été réalisée sur 25 trios (propositus ainsi que 2 parents) de familles françaises à partir des patients retrouvés non mutés en NGS et en CGH/SNP array. Après vérification de la qualité des ADN (quantification et sur gel), les échantillons d'ADN des trios ont été passés sur la plateforme de l'institut Imagine (Hôpital Necker) puis analysés au laboratoire d'Hématologie (Julie Galimand, Mélanie Nehlich, **Manon Saby**, Pr L. Da Costa, Hôpital R. Debré). Les résultats ont permis l'identification de 8 gènes candidats. Le caractère pathogène des variations alléliques a été confirmé selon les recommandations de l'ANPGM. Puis les mutations ont été validées par un séquençage Sanger et la ségrégation familiale a été étudiée. Certains gènes possèdent des liens avec des mécanismes de prolifération et de différenciation cellulaires. Ils interviennent dans la biogenèse du ribosome. Après identification d'une mutation dans notre cohorte, nous contactions le consortium EuroDBA afin de vérifier si cette mutation était présente chez d'autres familles européennes. En cas de réponse positive, ces familles étaient inclues dans l'étude au même titre que les familles françaises.

Dans mon manuscrit de Thèse, je me suis focalisée sur 4 gènes parmi les 8 identifiés : *RPL9, HEATR3*, *HSPA14* et *CECR1*. Les autres sont en cours d'étude (**Manon Saby** et Adeline Mayeux, ingénieur d'étude).

Pour chacun des patients possédant un des gènes identifiés, une étude de l'érythropoïèse a été réalisée via des cultures cellulaires primaires érythroïdes obtenues à partir de cellules $CD34^+$ issues de sang périphérique ou de moelle osseuse des patients porteurs de ces variations alléliques. Pour chacun des patients, j'ai procédé à l'étude de la prolifération et de la différenciation érythroïde, de l'apoptose et du cycle cellulaire durant toute la différenciation de la lignée de J0 à J15 quand cela était possible. J'ai également étudié, dans des lignées lymphoblastoïdes infectées par le virus EBV générées à partir des patients ou dans les cellules érythroïdes issues des $CD34^+$, d'une part le niveau d'expression de la protéine p53 ainsi que ces cibles (p21, Bax) et d'autre part celui des protéines impliquées dans la survie cellulaire ou l'apoptose par des techniques de RT-qPCR et de Western Blot.

L'identification de nouveaux gènes candidats dans la maladie est d'une importance capitale pour l'amélioration i) du diagnostic, ii) du conseil génétique et iii) la découverte de

nouvelles voies de signalisation qui pourraient conduire à la mise au point de nouveaux traitements dans l'ABD.

I. Identification de nouvelles protéines ribosomiques impliquées dans l'ABD et dans diverses ribosomopathies

L'anémie de Blackfan-Diamond caractérisée par une érythroblastopénie peut s'accompagner de malformations physiques et d'un risque de cancer, en particulier de tumeurs malignes hématologiques, mais aussi d'ostéosarcomes et de carcinomes du côlon. Nous avons identifié un nouveau gène de RP impliqué dans l'ABD, *RPL9*, qui code pour la sous-unité 60S du ribosome. Des travaux collaboratifs (équipe A. MacInnes, AMC, Amsterdam, pour un variant de *RPL9* et équipe B. Isidor, Nantes, pour le variant de *RPL13*) ont montré que certains gènes codant des RP peuvent être associés à une insuffisance médullaire dans le cas de l'ADB mais aussi à d'autres phénotypes amenant à la survenue de cancers. Les deux études menées et présentées ci-dessous exposent ces résultats.

A. Variations alléliques du gène RPL9

1. Contexte scientifique

A ce jour, une seule variation allélique (c.375G>C ; p.Arg125Ser) du gène *RPL9* avait été reportée dans l'anémie de Blackfan-Diamond. Cependant, cette variation fut déclarée de signification indéterminée puisqu'elle n'avait aucun effet sur la maturation des ARNr (signature fonctionnelle de l'ABD) (Gazda et al., 2008).

Notre première étude porte sur différents variants du gène *RPL9*. Grâce à un travail collaboratif, nous montrons que *RPL9* est bien un gène impliqué dans l'ABD. Il n'a en revanche jamais été associé à une autre maladie humaine auparavant ni à un risque de cancer. Par un travail collaboratif impliquant 4 équipes : une hollandaise (A. MacInnes, AMC, Amsterdam), une toulousaine (PE. Gleizes, MF O'Donohue, Université Paul Sabatier, Toulouse), une italienne (L. Montanaro, Bologne) et une parisienne (notre équipe), nous avons pu identifier et confirmer que *RPL9* était bien un gène responsable de l'ABD mais qu'il était également associé, selon le type de mutation, à un risque accru de cancer. Notre étude tente de déterminer les similitudes et les différences entre les différents variants trouvés dans ce gène. Nous tentons également de déterminer la manière dont les variants pourraient contribuer aux phénotypes cliniques associés. L'analyse génétique de trio de famille de patients ABD par le séquençage d'exomes a révélé la présence d'un variant de *RPL9* dans la 5'UTR en position c.-2+1G>C

(NM_000661.4) pour une de ces familles. En parallèle, le séquençage d'exomes de l'ADN tumoral et germinal d'une famille présentant de multiples incidences de cancer a révélé un variant faux sens en position c.59T>C ; p.Leu20Pro dans le gène *RPL9*

2. Résultats

Nous exposons la présence d'effets différents selon les deux variants alléliques identifiés de *RPL9*. Dans le cas du variant en 5'UTR, notre équipe a pu montrer que les cellules primaires $CD34^+$ présentent des défauts de prolifération et de différenciation érythroïde, et une stabilisation de la protéine p53 avec activation de la p21, induction de l'apoptose et arrêt du cycle cellulaire. A l'inverse, les cellules érythroïdes portant le variant p.Leu20Pro ne semblent pas avoir de défaut prolifératif. De plus, dans le cas de la variation 5'UTR, l'expression de la protéine RPL9 est diminuée alors qu'elle est normalement exprimée dans le cas du variant p.Leu20Pro, ce qui suggère dans un cas le classique mécanisme d'haploinsuffisance responsable de l'ABD et dans l'autre, un gain de fonction. Ces résultats sont tout à fait conformes avec le phénotype clinique des patients porteur du variant p.Leu20Pro qui ne présentent pas d'insuffisance médullaire ou d'anémie.

Les équipes de PE. Gleizes et de A. MacInnes ont pu montrer que les différents variants du gène *RPL9* entraînent des défauts similaires dans la maturation des pré-ARNr lors de la biogenèse des ribosomes et des réductions des monosomes 80S imitant le knock-down de RPL9 dans la lignée HeLa par des siRNA spécifiques suggérant une pathogénicité des variants. Les cellules portant le variant 5'UTR subissent une réduction importante du nombre de sous-unités ribosomiques 60S mais ne semblent pas déclencher une signalisation pour une synthèse plus élevée de ribosomes à l'inverse du variant p.Leu20Pro. Cela peut être expliqué par le fait que les cellules porteuses de mutations de gènes RP identifiées dans l'ABD ralentissent le taux global de synthèse de la protéine *de novo* par rapport aux cellules porteuses de mutations de gène RP affectant la fidélité translationnelle (équipe L. Montanaro).

L'équipe hollandaise (MacInnes) a pu montrer sur des cellules lymphoblastoïdes issues de patients ABD immortalisées par le virus EBV que la variation allélique en 5'UTR du gène *RPL9* impacte le métabolisme en altérant la glycolyse. En effet, le variant induit la gluconéogenèse afin de générer du glucose à partir de sources non glucidiques telles que les acides aminés. Ce catabolisme sembler entraîner une augmentation de l'ammoniac, une substance toxique pour les cellules qui l'excrètent en régulant à la hausse le cycle de l'urée. Les

acides aminés semblent être utilisés pour fournir de l'énergie à la cellule mais pas pour la traduction de protéines ce qui expliquerait l'augmentation de la stabilisation de la TP53. En revanche, les cellules porteuses du variant p.Leu20Pro montrent des changements dans le métabolisme du glutamate. Le variant p.Leu20Pro s'incorpore au sein du ribosome mature et altère son activité translationnelle en augmentant la lecture des codons UAG et UGA. D'autres part, les poissons zèbre hétérozygotes et homozygotes pour *rpl9* récapitulent le phénotype de l'anémie dans l'ABD mais ne développent pas de tumeurs. Le variant 5'UTR du gène *RPL9* rend le gène haploinsuffisant alors que le variant p.Leu20Pro peut être décrit comme une mutation « gain de fonction » puisque la protéine mutée est incorporée dans les ribosomes matures et modifie l'interprétation de certains codons, notamment les codons stop de l'ARNm.

3. Conclusion

En conclusion, notre étude qui s'est inscrite dans un travail européen collaboratif (consortium EURODBA) a pu montrer que *RPL9* est un gène impliqué dans la survenue de l'ABD. Cependant, cette étude fait état de différents variants du gène *RPL9* entraînant des anomalies similaires dans la maturation des pré-ARNr mais avec des répercussions différentes en aval de celui-ci. L'ensemble des résultats suggèrent un modèle selon lequel les cellules porteuses d'un variant d'une RP de la grande sous-unité, RPL9 liée à l'ABD génèrent moins de sous-unités ribosomiques 60S, réduisent la glycolyse en faveur de la gluconéogenèse et catabolisent les acides aminés comme source de carbone. Cependant, des expériences futures sont nécessaires pour expliquer pleinement la nature exacte des profils métaboliques. De plus, une augmentation de la stabilisation de la TP53 induisant une diminution de la prolifération cellulaire et une apoptose est observée. En revanche, d'autres variants de la RP, uL6 (RPL9) comme p.Leu20Pro semble compromettre la biogenèse des ribosomes par une augmentation de codons stop. Cela a pour effet d'augmenter la synthèse de ribosomes dans la finalité d'empêcher le ralentissement de la prolifération cellulaire et favoriserait la cancérogenèse. Les résultats présentés suggèrent que les effets en aval des défauts de maturation des pré-ARNr peuvent considérablement diverger en fonction du variant identifié au sein d'un même gène de RP.

Ce travail fait l'objet d'un article accepté le 21/10/2019 dans Nucleic Acid Research que je signe en co-premier auteur.

Ribosomal protein gene *RPL9* variants can differentially impair ribosome function and cellular metabolism

Marco Lezzerini[1]*, Marianna Penzo[2]*, Marie-Françoise O'Donohue[3]*, Carolina Marques dos Santos Vieira[4]*, Manon Saby[5]*, Hyung L. Elfrink[1,6], Illja Diets[7], Anne-Marie Hesse[8], Yohann Couté[8], Marc Gastou[9],[10],[11], Alexandra Nin-Velez[12], Peter G. J. Nikkels[13], Alexandra N. Olson[4], Evelien Zonneveld-Huijssoon[14],[15], Marjolijn C.J. Jongmans[15,16], GuangJun Zhang[12], Michel van Weeghel[1,6], Riekelt H. Houtkooper[1], Marcin W. Wlodarski[17],[18], Roland P. Kuiper[15], Marc B. Bierings[16], Jutte van der Werff ten Bosch[19], Thierry Leblanc[20], Lorenzo Montanaro[2], Jonathan D. Dinman[4], Lydie Da Costa[5,9,10,21], Pierre-Emmanuel Gleizes[3], Alyson W. MacInnes[1,22]✉

Running title: *RPL9* variants in human disease

Abstract

Variants in ribosomal protein (RP) genes drive Diamond-Blackfan anemia (DBA), a bone marrow failure syndrome that can also predispose individuals to cancer. Inherited and sporadic RP gene variants are also linked to a variety of phenotypes, including malignancy, in individuals with no anemia. Here we report an individual diagnosed with DBA carrying a variant in the 5'UTR of *RPL9* (uL6). Additionally, we report two individuals from a family with multiple cancer incidences carrying a *RPL9* missense variant. Analysis of cells from these individuals reveals that despite the variants both driving pre-rRNA processing defects and 80 monosome reductions, the downstream effects are remarkably different. Cells carrying the 5'UTR variant stabilize TP53 and impair the growth and differentiation of erythroid cells. In contrast, ribosomes incorporating the missense variant erroneously read through UAG and UGA stop codons of mRNAs. Metabolic profiles of cells carrying the 5'UTR variant reveal an increased metabolism of amino acids and a switch from glycolysis to gluconeogenesis while those of cells carrying the missense variant reveal a depletion of nucleotide pools. These findings indicate that variants in the same RP gene can drive similar ribosome biogenesis defects yet still have markedly different downstream consequences and clinical impacts.

Introduction

Diamond-Blackfan anemia (DBA) (OMIM# 105650) is an inherited bone marrow failure disorder that typically presents in children less than one year of age. While the central phenotype is pure red cell aplasia and a paucity of erythroblast precursor cells in the bone marrow, a number of physical malformations are also linked to DBA (1). These include (but are not limited to) craniofacial malformations, growth retardation, abnormalities in the extremities (especially the thumb), heart defects, and urogenital defects (2,3). DBA patients also have an elevated cancer risk, particularly hematologic malignancies, osteosarcoma, and colon carcinoma (4,5).

With rare exceptions, DBA is a disease linked to RP gene variants (6). These RPs include eS7 (*RPS7*), uS8 (*RPS15A*), eS10 (*RPS10*), eS17 (*RPS17*), eS19 (*RPS19*), eS24 (*RPS24*), eS26 (*RPS26*), eS27 (*RPS27*), eS28 (*RPS28*), uS14 (*RPS29*), uL18 (*RPL5*), uL5 (*RPL11*), eL15 (*RPL15*), eL18 (*RPL18*), uL24 (*RPL26*), eL27 (*RPL27*), eL31 (*RPL31*), uL29 (*RPL35*), eL33 (*RPL35A*) (7-21), and a phenotype resembling DBA has been identified in one individual carrying a variant in uL4 (*RPL4*) (22). DBA mutations are heterozygous and result in haploinsufficiency of the corresponding RP, which affects processing of the pre-ribosomal RNA (pre-rRNA) in a RP-specific manner. *RPL9* gene allelic variation has so far been reported in one DBA-affected individual, however this c.375G>C; p.Arg125Ser variation was declared to be a variant of unknown significance (VUS) since cells from this patient did not show a pre-rRNA processing defect similar to that observed upon knockdown of RPL9 with siRNAs (9). Although the pathophysiology linking RP variants to the DBA bone marrow failure phenotype is not entirely understood, the stabilization of the TP53 tumor suppressor protein is thought to occur due to ribosomal stress and in turn plays a role in impairing the proliferation of $CD34^+$ erythroblast precursor cells (23-25). In fact, a recent study reported germinal *TP53* gene activating variants in two individuals with a DBA-like phenotype that includes erythroblastopenia (26).

An increasing number of RP genes carrying inherited or sporadic variants are being uncovered that do not drive the bone marrow failure that is the hallmark of DBA. Missense variants in *RPS23* (OMIM #617412) and *RPL10* (OMIM #300847 and #300998) are found in individuals with dysmorphism, autism, and intellectual disability who have no evidence of a hematological phenotype (27-30). Somatic variants in RP genes have also been found in several cancer exomes. These include acute lymphoblastic T-cell leukemia (T-ALL) (*RPL10* and *RPL5*); glioma, melanoma, and breast cancer (*RPL5*); colorectal and endometrial cancer (*RPL22*); and chronic lymphocytic leukemia (*RPS15*) (31-34). Inherited variants in *RPS20* have also been reported linked to hereditary nonpolyposis colon carcinoma (OMIM #120435)(35). Although none of these variants have been shown to drive stabilization of TP53, the *RPS23* p.Arg67Lys variant linked to dysmorphism and the *RPL10* p.Arg98Ser variant linked to T-ALL are reported to alter the translational fidelity of ribosomes by increasing frameshifting and the readthrough of stop codons (28,36) Interestingly, despite not driving an anemia phenotype and having no observed effect on TP53, the missense variants in *RPS23* p.Arg67Lys and *RPL10* p.Arg98Ser have been reported to impair the processing of pre-rRNA and affect the formation of polysomes (28,37). Thus, it appears that variants in RPs that impair ribosome biogenesis do not universally drive anemia and that the clinical phenotypes linked to the variants are dependent on a more complex set of events.

Here we report that different variants in *RPL9*, a gene that has not been definitively described in DBA or other human disease, drive similar defects in the processing of pre-rRNA during ribosome biogenesis yet

reveal markedly different downstream effects on the TP53 pathway, erythrocyte development, metabolism, and the ability of ribosomes to recognize mRNA stop codons. This study endeavors to unravel the similarities and differences between variants found in the same RP gene and how they might ultimately contribute to the resulting clinical phenotypes.

Materials and Methods

Patients. One individual was identified within the European DBA (EuroDBA) consortium registries. The diagnosis of DBA in this individual was established based on typical features including aregenerative anemia with erythroid hypoplasia (1). Two other individuals (mother and son) were identified in a study on genetic predisposition for childhood cancer. Written informed consent was obtained from patients and/or parents prior to inclusion in this study, which was performed in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki. All procedures herein were performed according to the standards of the institutional and national ethical boards.

Cell culture and treatment with siRNA duplexes. Lymphoblastoid cell lines (LCLs) were derived from EBV-immortalization of peripheral mononuclear cells isolated from whole blood using Ficoll (GE Life Sciences) and grown in RPMI (Gibco) containing 10% fetal calf serum (FCS), 1% L-glutamine, and 1% penicillin/streptomycin as previously described (38). HeLa cells were cultured in DMEM (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum and 1 mM sodium pyruvate (Sigma). Two 19-mer siRNAs (Eurogentec), whose efficiency was verified by qPCR, were used to knock down expression of human uL6 mRNAs in HeLa cells: si-uL6-1 (5'-CCCAGAAAGAUGAAUUAAUdTdT-3') and si-uL6-2 (5'-GGGACUUCAAUCACAUCAAdTdT-3'). Each siRNA solution was added at a final concentration of 500 nM to 10^7 cells diluted in sodium phosphate buffer, pH 7.25, containing 250 mM sucrose and 1 mM $MgCl_2$. Electro-transformation was performed at 240 V with a Gene Pulser (Bio-Rad) (39). Control HeLa cells were electro-transformed with a scramble siRNA (siRNA-negative control duplex; Eurogentec). After 10 min incubation at ambient temperature, cells were plated and grown at 37°C for 48 hours.

Sanger sequencing of LCLs. mRNA from LCLs was isolated with Trizol (ThermoFisher) for generation of cDNA using the QuantiTect Reverse Transcription Kit 400 (Qiagen) per the manufacturers' instructions. Primers used for Sanger sequencing of the 5' UTR variant are FW:5'-TTCTCAGCAATCAGACTGTCG-3' and REV:5'-AGGCTGGTATTCTGGACAGC-3'. Primers used for sequencing the p.Leu20Pro variants are FW:5'-CGGGAAAGGACAGGTCGAAA-3' and REV:5'-GACAAGGTTCCGAGAGTGGG-3'.

Genomic studies and bioinformatics. Whole exome sequencing (WES) was performed using SOLiDv4 (Life Technologies) or HiSeq2500 (Ilumina) sequencers after enrichment with the Agilent SureSelectXT Human All Exon 50Mb kit. Data analysis was done with BioScopeTM and pathogenicity calculations were performed using standard prediction tools. For P3, both tumors (osteosarcoma and AML) were sequenced, as germline material derived from blood was not available due to a hematopoietic cell transplantation (HCT). Specific consent for making the exome sequencing data public was not granted. However, any questions regarding the data may be directed to the clinical geneticist, Marojolijn Jongmans, at M.C.J.Jongmans-3@umcutrecht.nl. Variants that were present in both tumors and in one of the parents were considered to be germline variants. The analysis focused on variants present in both tumors of the index patient (P3) and his affected mother (P2). Normal variation, defined as variants present in >10 cases of our in-house database and variants present with a frequency of more than 1% in dbSNP [build 144 (40)], the ExAC or the gnomAD database (41) were excluded. Missense variants were filtered based on Call quality (≥10 total reads with ≥20% variant reads), conservation score (PhyloP ≥ 3.0) and pathogenic prediction in two out of three computational prediction scores CADD PHRED (42) (version 1.3, >20), SIFT (43) (damaging) and PolyPhen2 (44) (possibly/probably damaging) using Alamut Visual software (v2.7.1., Interactive Biosoftware, Rouen, France). Multiple sequences alignments were performed using Clustal Omega online software (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo).

Total RNA extraction and analysis of pre-rRNA processing by northern blot. Total RNAs were extracted with Trizol from cell pellets containing 20 x 10^6 cells. The aqueous phase was further extracted with phenol-chloroform-isoamylic alcohol (25:24:1; Sigma), then with chloroform. Total RNAs were recovered after precipitation with 2-propanol. For Northern blot analyses, RNAs were dissolved in formamide, denatured for 10 min at 70°C and separated on a 1.2% agarose gel containing 1.2% formaldehyde and 1X Tri/Tri buffer (30 mM triethanolamine, 30 mM tricine, pH 7.9) (3 µg RNAs/lane). RNAs were transferred to a Hybond N^+ nylon membrane (GE Healthcare) by passive transfer. Pre-hybridization was performed for 1 hour at 45°C in 6X SSC, 5X Denhardt's solution, 0.5% SDS, 0.9 g/ml tRNA. The 5'-radiolabeled oligonucleotide probe was incubated overnight. The sequences of the probes were: 5'ITS1 (5'-CCTCGCCCTCCGGGCTCCGTTAATGATC-3'), ITS1-5.8S (5'-CTAAGAGTCGTACGAGGTCG-3'), ITS2 (ITS2b: 5'-CTGCGAGGGAACCCCCAGCCGCGCA-3' and ITS2d/e: 5'-GCGCGACGGCGGACGACACCGCGGCGTC-3'), 18S (5'-TTTACTTCCTCTAGATAGTCAAGTTCGACC-3'), 28S (5'-CCCGTTCCCTTGGCTGTGGTTTCGCTAGATA-3'). Membranes were washed twice for 10 min in 2X SSC, 0.1% SDS and once in 1X SSC, 0.1% SDS, and then exposed. Signals were acquired with a Typhoon Trio PhosphoImager (GE Healthcare) and quantified using the MultiGauge software.

Polysome profiling analysis. 600 µg – 1 mg of total proteins from freshly lysed LCLs was loaded onto 10-50% sucrose gradients as previously described (45). The tubes were centrifuged at 4°C and at 36,000 rpm for 2 hours in a SW41 rotor (Optima L100XP ultracentrifuge; Beckman Coulter). The gradient fractions were measured at OD_{254} using a syringe pump and UV detector (Brandel) and collected with a Foxy Jr. gradient collector (Teledyne Isco).

Western blot analysis. For TP53 stabilization, LCLs were plated at 100,000 per well of a 6 well dish overnight and camptothecin (100nM in DMSO) (Sigma) or an equal volume of DMSO as a vehicle control was added to wells for 6 hours before lysis in RIPA buffer with proteasome inhibitors (Sigma). 10% acrylamide gels were run for detection of TP53 (Santa Cruz #sc-6243) and actin (Santa Cruz #sc-1616).

Zebrafish mutant strains and o-dianisidine staining. Zebrafish hi1422 (*rpL9*) mutants were created in the lab of Dr. Nancy Hopkins and maintained as described (46). Matings were performed between two adult heterozygous hi1422 fish. At 2 days post fertilization (dpf) embryos were stained with o-dianisidine (Sigma) as previously described (47). Scoring of the phenotype severity was done blindly. Embryos from the hi1422 mating were genotyped after staining using Sanger sequencing with primers 1422-5: 5'-ACCTGGAACTCAGTCTGTTGG-3' hi14223R1: 5'-GCTTGCAGGCAGAGTGGGAG-3'; MSL4 (viral): 5'-GCTAGCTTGCCAAACCTACAGGT-3'. 3-primer PCR conditions were 95°C for 3min; (95°C 30' sec, 55°C 30 sec, 72°C 1 min) X 35; 72°C 5 min; 12°C.

Erythroid cell culture assays. Erythroid cell culture assays were performed as previously described (25,48). Antibodies and stains for FACS analysis were PC7 or PE conjugated CD34 (Beckman coulter, Brea, CA, USA), APC conjugated CD36 (BD Biosciences San Jose, CA, USA), APC conjugated Band 3 (kindly provided by Mohandas Narla's lab, NYBC, New York, USA), PE/Cy7 conjugated IL-3R (Miltenny, Paris, France), PE/Cy7 (PE)-coupled GPA (Life Technologies Carlsbad, CA, USA), and DAPI (Sigma). Antibodies for western blotting were TP53 (Sigma #5816), CDKN1A/p21 (Cell Signaling #2947), actin (Sigma #Ac-15), and uL6 (Abcam #ab102011). FACS analysis was conducted on a BD Biosciences Influx flow cytometer (BD Biosciences San Jose, CA, USA). Data were analyzed using Kaluza software (Beckman coulter, Brea, CA, USA).

Immunohistochemistry. Colon tissue was biopsied and slides stained by standard Haemotoxylin and Eosin (H&E) staining for morphology. Antibodies used for staining were against TP53 (Dako #M7001) and CD3 (Dako #A0452).

Translational fidelity reporters. For the cell-based assays a new generation of dual luciferase reporters was generated by Loughran et al. to correct interference of test sequence with stability and activity of *Renilla* and firefly luciferases (49). Plasmid pSGDluc, which contains tandem StopGo sequences (2A) on either side of the test sequence (49), was kindly provided by Dr. John Atkins, at University College Cork. In order to disrupt the *BamHI/SalI* sites present downstream of the firefly luciferase coding sequence, complimentary oligonucleotides (BamSalKilT and BamSalKilB, sequences available upon request) were ligated with linearized vector. The resulting plasmid was doubly digested with *XhoI* and *ApaI*, and the vector portion was used in Gibson assembly. A gBlock (sequences available upon request) was used to insert the HIV -1 PRF signal (50,51) between new *SalI* and *BamHI* sites. After sequence verification, the resulting plasmid (pJD2256) was linearized with *BamHI* and *SalI*, and another set of complementary oligonucleotides (Alphahelixspacer-T2 and Alphahelixspacer-B2, sequences available upon request) was used to insert an alpha helix spacer which creates an open reading frame encoding the peptide sequence: EAAAKEAAAKA. The resulting plasmid, pJD2257, was used as the zero frame dual luciferase reporter. pJD2337 (PEG10) was used to monitor -1 PRF, and pJD2349 (OAZ1) was used to monitor +1 PRF. pJD2443 (UAA), pJD2444 (UGA), and pJD2445 (UAG) were used to monitor stop codon readthrough. To make the constructs used to monitor PEG10 (52,53) and OAZ1 (54) mediated -1 and +1 PRF, gBlocks were inserted in linearized pJD2257 by Gibson Assembly (sequences available upon request). To make the constructs used to monitor stop codon readthrough, sets of complimentary oligonucleotides (sequences available upon request) were ligated with linearized pJD2257.

Translational fidelity cell-based assays. Deidentified LCLs were transfected by electroporation using an Amaxa™ Nucleofector II apparatus and Cell Line Nucleofector® Kit V (Lonza), per the manufacturer's instructions. For each transfection, 1.5 x 10^6 cells were mixed with 1.5 µg of plasmid DNA. All assays were performed in triplicate four independent times. Cell lysates were prepared using passive lysis buffer and luciferase activities were determined using the Dual-Luciferase® Reporter Assay System and a GloMax-Multi+ Detection System (Promega), per the manufacturer's instructions 24 hours post-transfection. Data were analyzed by dividing the ratio of firefly luciferase to *Renilla* luciferase for each of the experimental plasmids by the same ratio for the readthrough plasmid control in the same experiment. Data were plotted on GraphPad Prism as percent translational recoding, with each symbol representing one biological sample assayed in triplicate. Error bars represent standard deviation. Normal distribution of the data was determined by the Shapiro-Wilk normality test. Statistical significance was obtained by one-way ANOVA, followed by Holm-Sidak's multiple comparisons test. Adjusted p-values were reported on graphs as *p<0.05, and **p<0.01.

Translational fidelity cell-free assays. Cell-free assessment of ribosome fidelity was performed essentially as previously described (55,56). Briefly, cytoplasmic cellular lysates were prepared from subconfluent LCLs. From these lysates, ribosomes were purified in stringent conditions on a discontinuous sucrose gradient by a 15-16 h centrifugation at 160,000g. To test STOP codon readthrough, assays were performed for 60 min at 30°C in reaction mixtures containing 30 mM Hepes/KOH, pH 7.5, 80 mM KCl, 1.8 mM magnesium acetate, 50 µM of each amino acid, 1 mM ATP, 0.25 mM GTP, 5 mM creatine phosphate, 0.18 mg/ml creatine phosphokinase, 0.5 mM DTT, 0.4 mM spermidine, S-140 (40% of reaction volume), ribosomal salt wash (4% of reaction volume), 300 ng of capped reporter mRNA [wild type (WT) or STOP mutant firefly luciferase (FLuc) mRNAs were mixed with an mRNA coding for Renilla luciferase (RLuc), as an internal reference, in a 49:1 ratio], and 0.125 pmol ribosomes. After incubation time, the reactions were stopped on ice and RLuc and FLuc activities were measured using a Dual-Luciferase Reporter assay (Promega Corp.), following manufacturer's specifications. To calculate the relative STOP codon readthrough (expressed in %), FLuc/RLuc ratios were calculated for each sample, after background subtraction. Then, for each ribosome type, the STOP mutant FLuc/Rluc ratio was expressed as percentage of WT FLuc/RLuc ratio. Subsequently, the ratios obtained for mutant samples were normalized on the averaged ratios obtained for WT samples.

Mass spectrometry (MS)-based proteomic analyses

Proteins from cell-free ribosomal preparations were solubilized in Laemmli buffer before being stacked in the top of a 4–12% NuPAGE gel (Life Technologies), stained with R-250 Coomassie blue (Bio-Rad) and in-gel digested using modified trypsin (sequencing grade, Promega) as previously described (57).

The dried extracted peptides were resuspended in 5% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid and analyzed by online nanoliquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (Ultimate 3000 RSLCnano and the Q-Exactive HF, Thermo Fisher Scientific). Peptides were sampled on a 300 µm 5mm PepMap C18 precolumn (Thermo Fisher Scientific) and separated on a 75 µm 250 mm C18 column (Reprosil-Pur 120 C18-AQ, 1.9 µm, Dr. Maisch HPLC GmbH). The nano-LC method consisted of a 120 min multi-linear gradient at a flow rate of 300 nl/min, ranging from 5 to 33% acetonitrile in 0.1% formic acid. The spray voltage was set at 2 kV and the heated capillary was adjusted to 270 °C. Survey full-scan MS spectra (m/z=400–1600) were acquired with a resolution of 60 000 after the accumulation of 10^6 ions (maximum filling time 200 ms). The 20 most intense ions were fragmented by higher-energy collisional

dissociation after the accumulation of 10^5 ions (maximum fillingtime 50 ms). MS and MS/MS data were acquired using the software Xcalibur (Thermo Scientific).

Data were processed automatically using Mascot Distiller software (version 2.7.1.0, Matrix Science). Peptides and proteins were identified using Mascot (version 2.6) through concomitant searches against Uniprot (Homo sapiens taxonomy, June 2019 version), the mutated RPL9 protein sequence, classical contaminants database (homemade) and their corresponding reversed databases. Trypsin/P was chosen as the enzyme and 2 missed cleavages were allowed. Precursor and fragment mass error tolerance were set, respectively, to 20 ppm and 25 mmu. Peptide modifications allowed during the search were: carbamidomethylation (fixed), acetyl (Protein N-terminal, variable) and oxidation (variable). The Proline software (http://proline.profiproteomics.fr) was used to filter the merged results: conservation of rank 1 peptide-spectrum match (PSM) with a minimal length of 7 and a minimal score of 25. PSM score filtering is then optimized to reach a False Discovery Rate (FDR) of PSM identification below 1% by employing the target decoy approach. A minimum of 1 specific peptide per identified protein group was set. Proline was then used to perform MS1-based label free quantification of the peptides and protein groups from the different samples. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD015218 (58).

uL6 structure modeling. Modeling of wild type uL6 structure compared to uL6 p.Leu20Pro was performed in Pymol using the mutagenesis function. Source file for this was RCSB PDB entry 3J7P, the structure of the 80S mammalian ribosome bound to eEF2 (59).

Metabolic profiling. For the cell culturing and liquid extraction: LCLs were seeded and cultured 24 hours before harvesting at an appropriate density for logarithmic cell growth. Cells were washed 0.9% (w/v) NaCl (Fresenius Kabi, Germany) and harvested in 1 mL ice-cold 5/5 (v/v) methanol (Biosolve, The Netherlands) – water, transferred to 2 mL safe-lock Eppendorf (Germany) tubes. Internal standards D_3-alanine, D_3-aspertate, D_3-Arginine, D_3-proline, D_3-leucine, $^{13}C_1$-citruline, D_3-methionine, D_3-aspartic acid, D_4-tyrosine, D_4-lysine, D_8-valine, D_6-ornithine, D_3-serine, D_5-tryptophan, D_5-glutamine, D_5-phenylalanine, D_3-glutamate, $^{13}C_3$-pyruvate, $^{13}C_6$-isoleucine, D_6-Succinate, $^{13}C_6$-glucose, $^{13}C_6$-fructose-1,6-biphosphate, $^{13}C_6$-glucose-6-phosphate, adenosine-$^{15}N_5$-monophosphate, adenosine-$^{15}N_5$-triphosphate and guanosine-$^{15}N_5$-monophosphate and guanosine-$^{15}N_5$-triphosphate (5 µM) were added to the homogenates prior to the

addition of 1 mL chloroform (Biosolve). The samples were vortexed and centrifuged at 14,000 rpm at 4°C. The aqueous upper-phase was collected and evaporated to dryness in a vacuum concentrator. The dried polar metabolites were reconstituted in 100 µL 6/4 (v/v) methanol – water. For the liquid chromatography and mass spectrometry: The analytical separation was performed on a Dionex Ultimate 3000 ultra-high performance liquid chromatography system (Thermo Fisher Scientific, USA) with a SeQuant Zic-cHILIC, 3 µm, 100Å, 100x2.1 mm PEEK coated HPLC column (1.50657.0001, Millipore, USA) kept at 15°C. Mobile phase A consisted of 5 mM ammonium acetate (Sigma-Aldrich, USA) in acetonitrile (Biosolve) – water (9:1 v/v) and mobile phase B consisted of 5 mM ammonium acetate in acetonitrile – water (1:9 v/v). The flow of the 35 min gradient was 0.25 or 0.4 mL/min, as explained below, and ran from 0% to 100% B. The initial equilibration ran at a flow of 0.25 mL/min at 0% B lasts 2 min. The linear gradient runs from 0% to 100% B between 2-28 min. The hold period at 100% B was maintained from 28-30 min and from 30-31 min the mobile phase was changed back to 0% B. Re-equilibration at 0% B is from 32-35 min with an increased flow of 0.4 mL/min. The injection volume was 5 µL. The analysis was performed on a Q Exactive Plus Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) with a HESI source with a spray voltage of 2.5 kV, a capillary temperature of 253°C, and the S-lens RF level set at 50.0. All the (remaining) source parameters were optimized using the automated algorithm from the Q Exactive Plus software (Exactive series slot #1, version 2.9 Build 2926). Data analysis was performed using Thermo Scientific Xcalibur software (Version 4.1.50, Build date Monday, October 09, 2017), and processed using in house developed statistical package in R (version 3.3.1, 2016-06-21). Enrichment analysis was performed with MetaboAnalyst 3.0 online software (https://www.metaboanalyst.ca).

Results

Gene variants in *RPL9* link to DBA and multiple cancer incidences. Whole exome sequencing (WES) of patient-parent trios identified an individual within the EuroDBA consortium registries with the heterozygous variant c.-2+1G>C (P1) in the 5'UTR of the *RPL9* gene (NM_000661.4) (Table 1 and Figure 1). The c.-2+1G>C variant appears to be *de novo* as both parents tested wild-type for *RPL9*. Sanger sequencing of cDNA from EBV-immortalized lymphoblast celllines (LCLs) derived from these individuals confirmed the presence of double peaks, indicating that the variant allele is expressed (Figure 1B). The c.-2G+1>C variant is predicted to be a splice site variation affecting the donor splice site of exon 1 (Figure 1C) and has previously not been reported in SNP databases. This individual, in addition to anemia, presented with an

abnormal thumb and colitis, the pathology of which was marked by apoptotic bodies, $CD3^+$ lymphocyte infiltration, and TP53 stabilization (Table 1 and Figure S1).

Another family carrying a *RPL9* variant was identified by WES within a study on childhood cancer predisposition [methods described in (60)]. This family consisted of a boy (P3) diagnosed with childhood cancer twice, and his mother (P2). P3 presented with conventional type osteosarcma (Table 1). Physical examination revealed a micropenis, short stature (-2.25SD), and no dysmorphic features. He was treated with chemotherapy according to the EURAMOS-1 protocol (good responder arm: 4x MAP, 2x MAPEI). Less than two years later at age 13 he developed acute myeloid leukemia (AML), subtype M5. This AML may have been secondary to the chemotherapy received for the osteosarcoma. However, this possibility was considered not likely given the short period of time between the chemotherapy and the AML, the fact that the karyotype was normal, the patient did not receive etoposide, and because the AML was very treatable (remission occurred very quickly, which is unusual with a typically aggressive secondary AML). The AML was treated with induction and consolidation chemotherapy according to the NOPHO-DHB AML 2012 protocol, and a subsequent HCT from a matched-unrelated donor (MUD). Family history showed that his mother (P2) was diagnosed with a squamous cell carcinoma of the vulva at age 43 and that she had tested negative for the human papilloma virus (HPV). She had no congenital anomalies or dysmorphic features, but had short stature as well (length 155cm, -2SD) which is a feature that is commonly reported in DBA-affected individuals (61).

WES was performed on germline DNA of both parents of P3, and tumor-derived DNA from both the osteosarcoma and the AML. No germline material of P3 could be obtained, since he had been HCT-treated. A missense variant in *RPL9* c.59T>C; p.Leu20Pro was identified in both types of tumors of P3, which was maternally inherited (from P2) and occurs in exon 3 (Figures 1C and S2). Given that this variant appeared in both tumors and in one parent of P3, we consider it a germline mutation. This Leu20 residue precedes a universally conserved residue in uL6 (Lys21), and is itself highly conserved in mammals, birds, frogs, and fish (Figure S3). Importantly, this residue preceding Lys21 is invariably hydrophobic, as it is found as isoleucine or valine in flies, worms, and yeast (Figure S3). No loss of heterozygosity or second hit mutations in *RPL9* in either of the tumors of P3 was present. Moreover, the exome sequencing of the two tumors revealed variants that were not present in either parents and as such considered to be somatic (Table S1), however none of these variants to date have any reported links to cancer. Sanger sequencing of LCLs derived from the mother (P2) revealed a double peak which was not present in the son (P3) given the LCLs were derived post-HCT (Figure 1B). This variant has been previously reported (rs141176319) at a very low frequency of 0.00005767. While it may be that some individuals carrying the variant are unaffected due to decreased penetrance of the variant, it is also possible that these individuals may be predisposed to

developing cancer later in life. Another possibility is that p.Leu20Pro is a VUS, although the following functional data suggest that this variant does have a detrimental effect on ribosome biogenesis resembling pathogenic DBA-linked RP gene variants.

***RPL9* variants impair the processing of pre-rRNA.** The normal processing and maturation of pre-rRNAs in humans, illustrated in Figure S4, is impaired at different steps by DBA-linked RP gene variants (9,11,62,63). To investigate the functional consequences of the newly identified RP gene mutations reported here, EBV-immortalized LCLs were generated from peripheral blood of the individuals in this study for ribosome biogenesis analysis. For comparison, two different siRNAs were used to knock down uL6 in HeLa cells (Figure S5). As seen on the northern blot of Figure S5A, depletion of uL6 leads to a clear accumulation of long early precursors [i.e., 45S, 43S, and 41S, as seen with the (ITS1)-5.8S probe]. Although 32S pre-rRNAs accumulate only slightly, 12S pre-rRNAs are clearly underrepresented (Figure S5A). This is evidenced by the 12S/32S ratios which are lower upon depletion of uL6 (Figure S5B) and suggests impairment in cleavage at site 4 in the maturation of 28S rRNA (Figure S4). A similar defect has been reported in yeast *S. cerevisiae* with an impaired cleavage at site C2 (similar to site 4 in humans) upon uL6 depletion (64) Our data show that the small subunit production is also impacted, with a clear accumulation of 30S and 18S-E pre-rRNAs (5'ITS1 probe, Figure S5A). Indeed, defective processing of pre-rRNAs of the large ribosomal subunit often affects 18S formation too. This is usually due to a delayed/impaired processing at site 2, which then favors direct cleavage at site E (thus leading to an accumulation of 36S and 36S-C pre-rRNA, as well as 18S-E pre-rRNA) (Figure S4). This is shown experimentally by a decrease of 21S/30S ratios and an increase of 18S-E/21S ratios for cells treated with uL6 siRNAs (Figure S5B) and suggests that cleavage of both the 5' external transcribed spacer (5'ETS) and internal transcribed space (ITS1) flanking the 18S rRNA is delayed (Figure S4).

Figure 2 summarizes the northern blot results obtained with LCLs derived from Patients 1 and 2 carrying the variants *RPL9* c.-2+1G>C and uL6 p.Leu20Pro, respectively, and the post-HCT LCLs from P3 (where the uL6 p.Leu20Pro variant is no longer present, see Figure 1B). The pre-rRNA profiles were compared to 2 healthy control LCLs. The phenotypes in cells from of Patients 1 and 2 recapitulate key features of the profile observed with *RPL9* siRNAs, namely the decrease of the 12S/32S and 21S/30S ratios (Figures 2A,B). An increase in the 30S/41S ratio (reflecting a decrease in 41S pre-rRNA) was observed only in the uL6 p.Leu20Pro LCLs of P2 and not the others, unveiling some difference in this variant compared to P1 (Figure 2B). The 18S-E/21S ratios were also slightly increased in LCLs from patients, although not as much as in the *RPL9*-depleted HeLa cells. As expected, pre-rRNA from post-HCT LCLs from P3 showed little difference from control cells

***RPL9* variants impair ribosomal subunit formation.** In order to determine how the variants in *RPL9* affect 40S and 60S ribosomal subunit formation, lysates of the HeLa cells transfected with the siRNAs against *RPL9* were first fractionated by ultracentrifugation on sucrose gradients and polysome profiles were analyzed by optical density (Figure S5C). These results show that the reduction of *RPL9* leads to a substantial reduction of the 60S large ribosomal subunits, along with a reduction of 80S monosomes, polysomes, and 40S ribosomal subunits peaks that accumulate likely due to the loss of available 60S subunits for joining (Figure S5C). Lysates of LCLs from healthy controls or individuals carrying *RPL9* variants were fractionated on sucrose density gradients and peak sizes measured (Figure 3). A substantial reduction of the 60S large ribosomal subunit, coupled to a reduction of the 80S monosomes, was observed in the polysome profiles of LCLs carrying the *RPL9* c.-2+1 variant (from P1) compared to control cells (Figures 3A,B), consistent with what is observed in Figure S5C when uL6 is knocked down in HeLa cells. A similar profile was observed with LCLs carrying the uL6 p.Leu20Pro variant (from P2), but the reduction of the 60S subunit was not as pronounced (Figure 3C). These results indicate that production of the 60S subunit is impaired in P1 and P2 cells, consistent with the pre-rRNA processing defects observed by northern blot in Figure 2.

Zebrafish models of *RPL9* loss-of-function recapitulate the anemia but not the cancer phenotype. Many (if not most) homozygous mutant zebrafish models of RP gene knockout by viral insertion (65) reveal a depletion of hemoglobin-expressing cells when embryos are stained with o-dianisidine (66,67). Interestingly, several of these zebrafish lines (17/28) as heterozygous adults are also prone to developing peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs) (46). We characterized the hematopoietic phenotype of a zebrafish line carrying a viral insertion in the *rpl9* gene that was previously generated (65). Figure 4A shows that at 4 days post-fertilization (dpf) embryos homozygous for the viral insertion in *rpl9* (*rpl9*$^{-/-}$) fail to inflate their swim bladders and subsequently die by 6-7 dpf. Staining of wild type and mutant zebrafish embryos at 2 dpf with o-dianisidine (followed by genotyping of single embryos) reveals different severities of the loss of hemoglobin-expressing cells, illustrated in Figure 4B. In clutches of embryos generated from mating two heterozygous *rpl9* mutant fish we found that both hetero- and homozygous embryos fail to generate hemoglobin-expressing cells to the same degree as wild type fish, in effect phenocopying the DBA anemia phenotype (Figure 4C). However, the *rpl9* heterozygous line is reported to be a non-tumor prone line, suggesting that at least in zebrafish models the mere reduction of *rpl9* mRNA is insufficient to drive cancer (68).

Erythroid cell culture assays reveal primary CD34^{+} cells carrying *RPL9* 5'UTR variants fail to proliferate. Erythroid cell culture assays show that hematopoietic progenitor cells can reveal reduced proliferation rates, delayed differentiation, and increased TP53-induced apoptosis in a manner that is largely

dependent on which RP gene is mutated or knocked down (25). To investigate the effects of the different *RPL9* variants, $CD34^+$ primitive erythroid progenitor (BFU-e) cells from Patients 1 and 2 were isolated from peripheral blood and plated in erythroid cell culture medium, then allowed to grow for 12-15 days alongside $CD34^+$ BFU-e cells isolated from a healthy individual. Figure 5A shows that $CD34^+$ cells derived from P1, the DBA-affected individual carrying the *RPL9* c.-2+1G>C variant in the 5'UTR, do not proliferate in red cell culture medium compared to cells from a healthy control. FACS analysis of cells from P1 compared to a healthy control also reveals higher levels of annexin V on days 7 and 13 and higher expression levels of CD34 at day 7, suggesting higher levels of apoptosis and delayed differentiation, respectively, in the cells from P1 (Figure S6A-E). In line with the higher levels of annexin V suggesting increased apoptosis, western blots in Figure S6F from cells collected at Day 7 reveal increased levels of TP53 and its downstream target CDKN1A (p21). Figure 5B reveals that the expression of uL6 on Day 7 is lower in cells carrying the 5'UTR variants. In contrast, Figure 5C reveals that $CD34^+$ cells derived from P2 carrying the p.Leu20Pro missense varant in uL6 (*RPL9*) proliferate normally compared to cells from a healthy control. Consistent with the fact that the P2 has no medical history of anemia, FACS analysis of P2 cells do not reveal any notable differences in expression of the erythrocyte differentiation markers Band3 or glycophorin A (GPA) compared to cells from a healthy control (Figure S7A,B). Moreover, in contrast to cells carrying the 5'UTR variant in Figure 5B, western blots in Figure 5D show that cells carrying the p.Leu20Pro variant do not reveal any reduction of uL6 protein. This result is consistent with the polysome profiles in Figure 3 revealing a greater reduction of 60S ribosomal subunits in the cells carrying the 5'UTR variant compared to the p.Leu20Pro variant.

The 5'UTR variant of *RPL9* is linked to TP53 stabilization in LCLs. One of the potential mechanisms behind the inability of $CD34^+$ cells to properly proliferate in DBA-affected individuals is that the RP variant drives ribosomal stress which in turn activates the TP53 pathway resulting in TP53 stabilization and initiation of apoptosis (69). This TP53 stabilization is shown in the differentiating erythroid cells carrying the 5'UTR variant in Figure S6F. To confirm this result, Figure 6 shows western blotting of LCLs derivefrom a healthy control, the DBA-affected individual carrying the 5'UTR variant in *RPL9* (P1, c.-2+1G>C), two other DBA-affected individuals (carrying truncating variants in *RPL15* (21)), and from P2 carrying the uL6 (*RPL9*) p.Leu20Pro missense variant. LCLs were treated with DMSO (as a vehicle control) or the topoisomerase inhibitor camptothecin (CPT) as a positive control for 6 hours before lysis. The blots were then probed with antibodies against TP53. Figures 6A and 6B show that LCLs derived from a healthy control reveal minimal expression of TP53 under basal (DMSO-treated) conditions, and the expected stabilization of TP53 upon a 6-hour treatment with CPT. In contrast, Figure 6A shows that LCLs derived from all the DBA-affected individuals including P1 with the *RPL9* c.-2+1 variant reveal substantially more stabilization of TP53 at basal levels, suggesting activation of the TP53 pathway even in the absence of exogenous stress. The addition of

CPT to these cells results in further stabilization of TP53. In contrast to the LCLs derived from DBA-affected individuals, Figure 6B shows that cells carrying the uL6 (*RPL9*) p.Leu20Pro missense variant do not reveal any basal level stabilization of TP53. These results are in line with the results in Figures 5 and S6 suggesting that cells carrying the p.Leu20Pro missense variant proliferate normally and are not subject to apoptosis as observed in the cells from the DBA-affected individual.

The uL6 p.Leu20Pro variant is linked to impaired translational fidelity. It has been previously reported that the somatic *RPL10* gene variant (uL16 p.Arg98Ser) linked to T-ALL in humans drives defects in translational fidelity by increasing frequencies of programmed -1 ribosomal frameshifting (-1 PRF) in yeast models (36). In order to determine if the uL6 (*RPL9*) p.Leu20Pro variant that is linked to cancer also reveals translational fidelity defects, we measured frameshifting and stop codon readthrough in two different assays with dual luciferase reporter vectors. First, we transfected deidentified LCLs [from a healthy control, P1 carrying the c.-2+1G>C variant or P2 carrying the uL6 (*RPL9*) p.Leu20Pro variant] by nucleofection with reporters designed to measure -1 or +1 PRF or readthrough of stop codons UAA, that have been previously described (28). Figure S8 shows that none of the LCLs tested in this assay reveal defects in -1 or +1 PRF or in readthrough of the UAA stop codon. However, Figure 7A shows that LCLs carrying the uL6 (*RPL9*) p.Leu20Pro variant do reveal significant increases (p<0.05 and 0.01) in the readthrough of UAG and UGA stop codons, with the most significant increase being a two-fold increase of UGA readthrough compared to healthy control LCLs and those carrying the 5'UTR variant. This observation was supported by a separate cell-free assay in Figure 7B designed to measure the translational fidelity of purified ribosomes isolated from the LCLs thahas also been previously described (55). This assay showed that only ribosomes isolated from LCLs carrying the uL6 (*RPL9*) p.Leu20Pro variant (but not the *RPL9* c.-2+1G>C variant) revealed a significant increase in the readthrough of the UAG stop codon over ribosomes purified from healthy control LCLs (Figure 7B).

In order to validate that the ribosomes from the LCLs eliciting the translation fidelity defect do in fact carry the uL6 p.Leu20Pro variant protein, we performed a MS-based proteomic analysis on triplicate purifications of mature ribosomes from P2 LCLs. This allowed the reliable identification of six different peptides mapping to the N-terminal of uL6. Three of these peptides carry a leucine residue at amino acid position 20 and correspond to the wild type sequence of *RPL9*, whereas the three others carry a proline residue at this position and correspond to the *RPL9* variant sequence (Figure 7C), indicating that both versions are present in mature ribosomes of P2. Since the identified Leu20 and Pro20 containing peptides are very close in sequence, we used label-free quantification to estimate and compare the abundances of the two uL6 peptide versions in ribosomes purified from P2 LCLs. As shown in Figure 7D, it revealed that these ribosomes from P2 LCLs contain about the same quantity of uL6 p.Leu20 and of uL6 p.Pro20 peptides compared to ribosomes purified from healthy control LCLs that exclusively contain uL6 p.Leu20 peptides.

These data suggest that the uL6 proteins generated from the wild type and mutated alleles of *RPL9* contribute about equally to the structure of mature ribosomes in LCLs carrying the uL6 p.Leu20Pro variant.

In order to visualize how the incorporated uL6 p.Leu20Pro protein might alter the ribosome we used Pymol software to model the uL6 structure and its surroundings with either the WT or variant version of the amino acid residue 20. Structural visualization of uL6 is shown in Figure 7E, where the protein is found situated in the ribosome between rRNA helix H97 (in cyan) and expansion segment 39 (ES39, in light purple). The WT version containing Leu20 is shown (in lime green), superimposed with the predicted structure of the variant uL6 p.Leu20Pro protein (in pink). The position of amino acid 20 is shown in red. This model predicts that a p.Leu20Pro variant changes the orientation of the end of a beta sheet, which in turn alters the angle of Lys21. Normally, Lys21 interacts with the phosphate group betwen A4764 and G4765 located in ES39 of the 28S rRNA (measured distance is 4.6 Angstroms, suggesting that this is a salt bridge) (59). A Pro20 is predicted to alter the orientation of Lys21, disrupting this interaction. This in turn is predicted to weaken the interaction between uL6 and the 28S rRNA. The model also predicts that the p.Leu20Pro variant has some large-scale effects on uL6 folding. These are predicted to affect the other side of the protein, particularly the loop domain that interacts with Helix 95 (H95) of the Sarcin/ricin loop (SRL, shown in gold). Importantly, the SRL plays a key role in activation of the GTPase activity of both the elongation factors (eEF1A and eEF2) as well as the release factor eRF1 (eEF2 is shown in dark purple). Specifically, the model predicts that this loop is displaced toward the SRL, creating the potential for a steric clash. We suggest that this may displace the SRL, interfering with its ability to optimally interact with the elongation and release factors. Consistent with the translational fidelity assays, it also suggests that this potentially altered interaction affects ribosome function, i.e. the ability to faithfully decode mRNAs.

***RPL9* variants drive different metabolic profiles in LCLs.** In order to determine how the different *RPL9* variants affect cellular metabolism, we used a MS-metabolomics approach to measure the levels of over 120 polar metabolites in LCLs derived from affected individuals and compared them to cells from three unrelated healthy controls. Figure 8A shows a heat map of metabolites in LCLs carrying the 5'UTR variant compared to the healthy controls sorted according to their Variable Importance in Projection (VIP) score, with only metabolites with a VIP score >1 shown. The enrichment analysis performed with Metabolanalyst 3.0 (70) showing the top 12 terms is shown for this profile in Figure 8B. These results suggest that glycolysis in the cells with the 5'UTR variant in *RPL9* is impaired and that the cells have switched to gluconeogenesis, the pathway that results in the formation of glucose from non-carbohydrate carbon sources such as gluconogenic amino acids. The catabolism of amino acids produces ammonia (71). As such, these cells also reveal significant enrichment of the terms "ammonia recycling" and the "urea cycle", presumably reflecting an excretion of the ammonia (which is highly toxic) resulting from the upregulated catabolism of amino acids during gluconeogenesis.

A remarkably different metabolic profile and set of enrichment terms are revealed when the same healthy control LCLs are compared to cells carrying the missense uL6 (*RPL9*) p.Leu20Pro variant. Figure 8C shows the most significantly downregulated metabolites are nucleotides AMP, CMP, GMP, and UMP while the most significantly upregulated metabolites are dCMP, guanosine, and inosine. In contrast to the LCLs carrying the 5'UTR variant, only the amino acid arginine is found significantly downregulated in LCLs carrying the missense variant. Figure 8D shows that the top enrichment term in the profiles from LCLs carrying the missense variant is "RNA transcription" with a 35-fold enrichment (due to the significant reduction of nucleotides) and there is no indication of impaired glycolysis as in the cells with 5'UTR variant. These results suggest that there are some substantial and fundamental differences in the metabolic consequences of the two variants.

Discussion

This study reports that different variants of *RPL9*, a gene that has not been definitively associated with human disease before, are linked to DBA or multiple cancer incidences. Exome sequencing of trios revealed an individual with DBA (P1) carrying a variant of *RPL9* in the 5'UTR. Exome sequencing of tumor and germ line DNA from a family with multiple cancer incidences (P2 and P3) brought to light a missense p.Leu20Pro variant in uL6 (*RPL9*) that is predicted to be damaging. All the variants tested showed defects in the processing of pre-rRNA and reductions of 80S monosomes that mimic the knockdown of *RPL9* in HeLa cells (Figures 2, 3, and S5), which strongly suggests that the variants are pathogenic.

Remarkably, the downstream effects of these seemingly similar pre-rRNA defects appear to be largely dependent on the type of variant. The stabilization of TP53 is only observed in cells carrying the *RPL9* 5'UTR variant (Figures 6 and S6F). In turn, only erythroid cells cultured from primary $CD34^+$ cells carrying the 5'UTR variant have defects in proliferation and differentiation defects and undergo apoptosis (Figure 5). In contrast, the p.Leu20Pro missense variant has little effect on $CD34^+$ cells in the erythroid cell culture assay (Figure 5). This is well in line with the fact that the individuals carrying the missense variant do not have any bone marrow failure or anemia phenotype.

The polysome profile results in Figure 3 indicate that the cells carrying the 5'UTR variant of *RPL9* suffer a very substantial reduction of the number of 60S ribosomal subunits. Given that this variant does not modify the uL6 protein itself, it is likely that it impairs translation of *RPL9* mRNA, which results in haploinsufficiency of this ribosomal protein gene as classically described in DBA. Consistently, TP53 is activated, presumably in response to the ribosomal stress resulting from uL6 limiting amount. The p.Leu20Pro variant in turn shows much less impairment of 60S subunit production on the gradients. While pre-rRNA processing is affected in this patient, this variant does incorporate in the mature ribosome and impairs its translational

fidelity by increasing the readthrough of UAG and UGA stop codons in a way that is not observed with the 5'UTR variant (Figure 7). As such, the uL6 p.Leu20Pro variant may be described as a gain-of-function, since it is changing how certain mRNA stop codons are interpreted. The structural analysis in Figure 7E suggests that the incorporation of the uL6 p.Leu20Pro variant may affect ribosomal domains such as the peptidyltransferase center and/or the Sarcin/Ricin loop (SRL) that are critical for maintaining translational fidelity of the ribosome (72). However, bona fide structural analysis of 60S ribosomal subunits incorporating the uL6 p.Leu20Pro variant will be required to make any conclusive statements in this regard.

Some of the most striking differences of the downstream effects of these *RPL9* variants may be found in the metabolic profiles. The profiles and enrichment analysis of LCLs derived from the DBA-affected individual (Figures 8A,B) suggest that cells carrying the 5'UTR variant impairs glycolysis and causes the cells to switch to gluconeogenesis as a means of generating glucose from non-carbohydrate sources, such as glucogenic amino acids. This catabolism of amino acids likely results in an increase of highly toxic ammonia which the cells then excrete by upregulating the urea cycle (another highly enriched term in the analysis of Figure 8B). In contrast, cells carrying the missense variant reveal a dramatic reduction of nucleotides that is not observed in the cells with the 5'UTR variant (Figure 8C). This is coupled to changes in glutamate metabolism that suggest an accelerated synthesis of RNA, a term that dominates the enrichment analysis in Figure 8D. A likely explanation for this profile and accompanying enrichment analysis is that the cells carrying the missense variant are signaling to increase the manufacturing of new ribosomes, which by definition would require a strong upregulation of rRNA synthesis and a depletion of nucleotide pools. Such a metabolic change is not observed with the 5'UTR variant, which may be partly explained by previous observations showing that cells carrying DBA-related RP gene mutations slow down the overall rate of protein synthesis compared to cells carrying RP gene mutations that predominantly affect translational fidelity (28). The switch to gluconeogenesis observed in the cells carrying the 5'UTR variant also suggests that amino acids in these cells are being preferentially used to supply the cell with energy and not for protein synthesis. The stabilization of TP53 in these cells that we observe may be an important factor governing this metabolic switch, as it is known that TP53 is able to suppress glucose transport into cells in addition to inducing gluconeogenesis (73)

We propose a genotype:phenotype model for *RPL9* whereby variants that drive the reduction of uL6 are sufficient to drive DBA but not cancer, in contrast to variants that impair translational fidelity. This is supported by the fact that heterozygous *rpl9* zebrafish are not reported to develop tumors (68), although our results in Figure 4 suggest that both the hetero-and homozygous mutant embryos recapitulate the DBA anemia phenotype. We recognize that in the absence of a mouse model it is difficult for us to state definitively that the cancers found in individuals P2 and P3 are directly linked to the *RPL9* p.Leu20Pro variant. The evidence suggesting the connection is as follows: 1) There are no other obvious driver

mutations found in the exomes of either tumor subject to sequence analysis. 2) The p.Arg98Ser variant in *RPL10*/uL16, linked to human T-ALL, drives translational fidelity defects including stop codon readthrough in yeast (36). 3) An increasing body of evidence is linking RP gene variants to different forms of human cancer. This includes DBA-linked and other inherited RP variants that increase the predisposition to cancer as well as variants that arise spontaneously (4,35,74). 4) The osteosarcoma and AML described here are cancers frequently observed in DBA patients. So, although we must remain cautious when describing the potential impact of the uL6 p.Leu20Pro variant, it does seem possible that the translational fidelity defects are contributing to instability in cells that ushers them closer to the tipping point of malignancy. Supporting this mechanism is the finding that yeast cells with a defective non-stop decay pathway (and synthesize aberrant proteins coded from 3'UTRs) reveal an increased sensitivity to oxidative stress, which has well-known links to cancer (75,76). This will be a very interesting area of future study as more variants in human genes coding for components that regulate mRNA translation are identified and characterized.

In sum, this study reports different variants of *RPL9*, a gene that has not been previously associated with human disease, drive similar defects in pre-rRNA processing yet have remarkably different impacts downstream of this initial ribosome biogenesis defect. The results suggest a model whereby cells carrying a DBA-linked RP variant generate fewer 60S ribosomal subunits overall, reduce glycolysis, switch to gluconeogenesis, and catabolize amino acids as a carbon source. This is accompanied by reduced cell proliferation, increased TP53 stabilization, and apoptosis. In contrast, the incorporation of the uL6 p.Leu20Pro variant into 60S ribosomal subunits does not severely affect the production rate of 60S subunit, but compromises the fidelity of the ribosome by increasing the readthrough of stop codons. Taken together, these results underscore the widening landscape of cellular and clinical phenotypes that are associated with human RP gene variants. They also suggest that despite similar pre-rRNA processing defects in cells carrying different variants of the same RP gene, the downstream effects can diverge dramatically and in ways that may help to clarify the biology underlying these complex genotype:phenotype relationships.

Acknowledgements

Our most special thanks go to the patients and their families. Very special thanks also to the DBA UK Charity for their generous support. Specific E-Rare grants funding EuroDBA researchers are as follows: ZonMW #40-44000-98-1008 in the Netherlands (AWM); #BMBF 01GM1609 in Germany (MW); #ANR-15-RAR3-0007-04 (PEG and MOD) and #ANR-12-RARE-0007-02 (LDC) in France. PEG, MFOD, and LDC are also funded by ANR-2015-AAP générique-CE12 (DBA-Multigenes) LDC is additionally supported by the Laboratory of Excellence for Red Cells [(LABEX GR-Ex)-ANR Avenir-11-LABX-005-02], and The French National PHRC OFABD (DBA registry). JDD and CMdSV are supported by a grant from the United States National Institutes of Health/National Heart Lung and Blood Institute (R01HL119439-01A1). GZ and ANO

are supported by Jim and Diann Robbers Cancer Research Grant for New Investigators. IJD is funded by the KiKa Foundation (project #127). MCJJ and ID are supported by Stichting Loeka (http://www.stichtingloeka.nl/). MP and LM are supported by Pallotti Legacy for Cancer Research.

References

1. Vlachos, A., Ball, S., Dahl, N., Alter, B.P., Sheth, S., Ramenghi, U., Meerpohl, J., Karlsson, S., Liu, J.M., Leblanc, T. *et al.* (2008) Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference. *British journal of haematology*, **142**, 859-876.
2. Ball, S.E., McGuckin, C.P., Jenkins, G. and Gordon-Smith, E.C. (1996) Diamond-Blackfan anaemia in the U.K.: analysis of 80 cases from a 20-year birth cohort. *Br J Haematol*, **94**, 645-653.
3. Lipton, J.M., Atsidaftos, E., Zyskind, I. and Vlachos, A. (2006) Improving clinical care and elucidating the pathophysiology of Diamond Blackfan anemia: an update from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Pediatric blood & cancer*, **46**, 558-564.
4. Vlachos, A., Rosenberg, P.S., Atsidaftos, E., Alter, B.P. and Lipton, J.M. (2012) Incidence of neoplasia in Diamond Blackfan anemia: a report from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Blood*, **119**, 3815-3819.
5. Vlachos, A., Rosenberg, P.S., Atsidaftos, E., Kang, J., Onel, K., Sharaf, R.N., Alter, B.P. and Lipton, J.M. (2018) Increased risk of colon cancer and osteogenic sarcoma in Diamond Blackfan anemia. *Blood*.
6. Boria, I., Garelli, E., Gazda, H.T., Aspesi, A., Quarello, P., Pavesi, E., Ferrante, D., Meerpohl, J.J., Kartal, M., Da Costa, L. *et al.* (2010) The ribosomal basis of Diamond-Blackfan Anemia: mutation and database update. *Human mutation*, **31**, 1269-1279.
7. Ban, N., Beckmann, R., Cate, J.H., Dinman, J.D., Dragon, F., Ellis, S.R., Lafontaine, D.L., Lindahl, L., Liljas, A., Lipton, J.M. *et al.* (2014) A new system for naming ribosomal proteins. *Current opinion in structural biology*, **24**, 165-169.
8. Cmejla, R., Cmejlova, J., Handrkova, H., Petrak, J. and Pospisilova, D. (2007) Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat*, **28**, 1178-1182.
9. Doherty, L., Sheen, M.R., Vlachos, A., Choesmel, V., O'Donohue, M.F., Clinton, C., Schneider, H.E., Sieff, C.A., Newburger, P.E., Ball, S.E. *et al.* (2010) Ribosomal protein genes RPS10 and RPS26 are commonly mutated in Diamond-Blackfan anemia. *American journal of human genetics*, **86**, 222-228.
10. Draptchinskaia, N., Gustavsson, P., Andersson, B., Pettersson, M., Willig, T.N., Dianzani, I., Ball, S., Tchernia, G., Klar, J., Matsson, H. *et al.* (1999) The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nature genetics*, **21**, 169-175.
11. Farrar, J.E., Nater, M., Caywood, E., McDevitt, M.A., Kowalski, J., Takemoto, C.M., Talbot, C.C., Jr., Meltzer, P., Esposito, D., Beggs, A.H. *et al.* (2008) Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, Rpl35a, in Diamond-Blackfan anemia. *Blood*, **112**, 1582-1592.
12. Gazda, H.T., Grabowska, A., Merida-Long, L.B., Latawiec, E., Schneider, H.E., Lipton, J.M., Vlachos, A., Atsidaftos, E., Ball, S.E., Orfali, K.A. *et al.* (2006) Ribosomal protein S24 gene is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *American journal of human genetics*, **79**, 1110-1118.
13. Gazda, H.T., Preti, M., Sheen, M.R., O'Donohue, M.F., Vlachos, A., Davies, S.M., Kattamis, A., Doherty, L., Landowski, M., Buros, C. *et al.* (2012) Frameshift mutation in p53 regulator RPL26 is associated with multiple physical abnormalities and a specific pre-ribosomal RNA processing defect in diamond-blackfan anemia. *Human mutation*, **33**, 1037-1044.
14. Gazda, H.T., Sheen, M.R., Vlachos, A., Choesmel, V., O'Donohue, M.F., Schneider, H., Darras, N., Hasman, C., Sieff, C.A., Newburger, P.E. *et al.* (2008) Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *American journal of human genetics*, **83**, 769-780.

15. Landowski, M., O'Donohue, M.F., Buros, C., Ghazvinian, R., Montel-Lehry, N., Vlachos, A., Sieff, C.A., Newburger, P.E., Niewiadomska, E., Matysiak, M. *et al.* (2013) Novel deletion of RPL15 identified by array-comparative genomic hybridization in Diamond-Blackfan anemia. *Human genetics*, **132**, 1265-1274.
16. Wang, R., Yoshida, K., Toki, T., Sawada, T., Uechi, T., Okuno, Y., Sato-Otsubo, A., Kudo, K., Kamimaki, I., Kanezaki, R. *et al.* (2015) Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*, **168**, 854-864.
17. Mirabello, L., Macari, E.R., Jessop, L., Ellis, S.R., Myers, T., Giri, N., Taylor, A.M., McGrath, K.E., Humphries, J.M., Ballew, B.J. *et al.* (2014) Whole-exome sequencing and functional studies identify RPS29 as a novel gene mutated in multicase Diamond-Blackfan anemia families. *Blood*, **124**, 24-32.
18. Gripp, K.W., Curry, C., Olney, A.H., Sandoval, C., Fisher, J., Chong, J.X., Genomics, U.W.C.f.M., Pilchman, L., Sahraoui, R., Stabley, D.L. *et al.* (2014) Diamond-Blackfan anemia with mandibulofacial dystostosis is heterogeneous, including the novel DBA genes TSR2 and RPS28. *American journal of medical genetics. Part A*, **164A**, 2240-2249.
19. Ikeda, F., Yoshida, K., Toki, T., Uechi, T., Ishida, S., Nakajima, Y., Sasahara, Y., Okuno, Y., Kanezaki, R., Terui, K. *et al.* (2017) Exome sequencing identified RPS15A as a novel causative gene for Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica*, **102**, e93-e96.
20. Mirabello, L., Khincha, P.P., Ellis, S.R., Giri, N., Brodie, S., Chandrasekharappa, S.C., Donovan, F.X., Zhou, W., Hicks, B.D., Boland, J.F. *et al.* (2017) Novel and known ribosomal causes of Diamond-Blackfan anaemia identified through comprehensive genomic characterisation. *Journal of medical genetics*.
21. Wlodarski, M.W., Da Costa, L., O'Donohue, M.F., Gastou, M., Karboul, N., Montel-Lehry, N., Hainmann, I., Danda, D., Szvetnik, A., Pastor, V. *et al.* (2018) Recurring mutations in RPL15 are linked to hydrops fetalis and treatment independence in Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica*, **103**, 949-958.
22. Jongmans, M.C.J., Diets, I.J., Quarello, P., Garelli, E., Kuiper, R.P. and Pfundt, R. (2018) Somatic reversion events point towards RPL4 as a novel disease gene in a condition resembling Diamond-Blackfan Anemia. *Haematologica*.
23. Dutt, S., Narla, A., Lin, K., Mullally, A., Abayasekara, N., Megerdichian, C., Wilson, F.H., Currie, T., Khanna-Gupta, A., Berliner, N. *et al.* (2011) Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood*, **117**, 2567-2576.
24. Jaako, P., Flygare, J., Olsson, K., Quere, R., Ehinger, M., Henson, A., Ellis, S., Schambach, A., Baum, C., Richter, J. *et al.* (2011) Mice with ribosomal protein S19 deficiency develop bone marrow failure and symptoms like patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood*, **118**, 6087-6096.
25. Moniz, H., Gastou, M., Leblanc, T., Hurtaud, C., Cretien, A., Lecluse, Y., Raslova, H., Larghero, J., Croisille, L., Faubladier, M. *et al.* (2012) Primary hematopoietic cells from DBA patients with mutations in RPL11 and RPS19 genes exhibit distinct erythroid phenotype in vitro. *Cell death & disease*, **3**, e356.
26. Toki, T., Yoshida, K., Wang, R., Nakamura, S., Maekawa, T., Goi, K., Katoh, M.C., Mizuno, S., Sugiyama, F., Kanezaki, R. *et al.* (2018) De Novo Mutations Activating Germline TP53 in an Inherited Bone-Marrow-Failure Syndrome. *American journal of human genetics*, **103**, 440-447.
27. Bourque, D.K., Hartley, T., Nikkel, S.M., Pohl, D., Tetreault, M., Kernohan, K.D., Care4Rare Canada, C. and Dyment, D.A. (2018) A de novo mutation in RPL10 causes a rare X-linked ribosomopathy characterized by syndromic intellectual disability and epilepsy: A new case and review of the literature. *European journal of medical genetics*, **61**, 89-93.
28. Paolini, N.A., Attwood, M., Sondalle, S.B., Vieira, C., van Adrichem, A.M., di Summa, F.M., O'Donohue, M.F., Gleizes, P.E., Rachuri, S., Briggs, J.W. *et al.* (2017) A Ribosomopathy Reveals Decoding Defective Ribosomes Driving Human Dysmorphism. *American journal of human genetics*, **100**, 506-522.
29. Thevenon, J., Michot, C., Bole, C., Nitschke, P., Nizon, M., Faivre, L., Munnich, A., Lyonnet, S., Bonnefont, J.P., Portes, V.D. *et al.* (2015) RPL10 mutation segregating in a family with X-linked syndromic Intellectual Disability. *American journal of medical genetics. Part A*, **167A**, 1908-1912.
30. Zanni, G., Kalscheuer, V.M., Friedrich, A., Barresi, S., Alfieri, P., Di Capua, M., Haas, S.A., Piccini, G., Karl, T., Klauck, S.M. *et al.* (2015) A Novel Mutation in RPL10 (Ribosomal Protein L10) Causes X-

Linked Intellectual Disability, Cerebellar Hypoplasia, and Spondylo-Epiphyseal Dysplasia. *Human mutation*, **36**, 1155-1158.

31. De Keersmaecker, K., Atak, Z.K., Li, N., Vicente, C., Patchett, S., Girardi, T., Gianfelici, V., Geerdens, E., Clappier, E., Porcu, M. *et al.* (2013) Exome sequencing identifies mutation in CNOT3 and ribosomal genes RPL5 and RPL10 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics*, **45**, 186-190.
32. Fancello, L., Kampen, K.R., Hofman, I.J., Verbeeck, J. and De Keersmaecker, K. (2017) The ribosomal protein gene RPL5 is a haploinsufficient tumor suppressor in multiple cancer types. *Oncotarget*, **8**, 14462-14478.
33. Ferreira, A.M., Tuominen, I., van Dijk-Bos, K., Sanjabi, B., van der Sluis, T., van der Zee, A.G., Hollema, H., Zazula, M., Sijmons, R.H., Aaltonen, L.A. *et al.* (2014) High frequency of RPL22 mutations in microsatellite-unstable colorectal and endometrial tumors. *Human mutation*, **35**, 1442-1445.
34. Landau, D.A., Tausch, E., Taylor-Weiner, A.N., Stewart, C., Reiter, J.G., Bahlo, J., Kluth, S., Bozic, I., Lawrence, M., Bottcher, S. *et al.* (2015) Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*, **526**, 525-530.
35. Nieminen, T.T., O'Donohue, M.F., Wu, Y., Lohi, H., Scherer, S.W., Paterson, A.D., Ellonen, P., Abdel-Rahman, W.M., Valo, S., Mecklin, J.P. *et al.* (2014) Germline mutation of RPS20, encoding a ribosomal protein, causes predisposition to hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma without DNA mismatch repair deficiency. *Gastroenterology*, **147**, 595-598 e595.
36. Sulima, S.O., Patchett, S., Advani, V.M., De Keersmaecker, K., Johnson, A.W. and Dinman, J.D. (2014) Bypass of the pre-60S ribosomal quality control as a pathway to oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**, 5640-5645.
37. Patchett, S., Musalgaonkar, S., Malyutin, A.G. and Johnson, A.W. (2017) The T-cell leukemia related rpl10-R98S mutant traps the 60S export adapter Nmd3 in the ribosomal P site in yeast. *PLoS genetics*, **13**, e1006894.
38. Hui-Yuen, J., McAllister, S., Koganti, S., Hill, E. and Bhaduri-McIntosh, S. (2011) Establishment of Epstein-Barr virus growth-transformed lymphoblastoid cell lines. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
39. Paganin-Gioanni, A., Bellard, E., Escoffre, J.M., Rols, M.P., Teissie, J. and Golzio, M. (2011) Direct visualization at the single-cell level of siRNA electrotransfer into cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 10443-10447.
40. Sherry, S.T., Ward, M.H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E.M. and Sirotkin, K. (2001) dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic acids research*, **29**, 308-311.
41. Lek, M., Karczewski, K.J., Minikel, E.V., Samocha, K.E., Banks, E., Fennell, T., O'Donnell-Luria, A.H., Ware, J.S., Hill, A.J., Cummings, B.B. *et al.* (2016) Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, **536**, 285-291.
42. Kircher, M., Witten, D.M., Jain, P., O'Roak, B.J., Cooper, G.M. and Shendure, J. (2014) A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nature genetics*, **46**, 310-315.
43. Kumar, P., Henikoff, S. and Ng, P.C. (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature protocols*, **4**, 1073-1081.
44. Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S. and Sunyaev, S.R. (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods*, **7**, 248-249.
45. Pereboom, T.C., van Weele, L.J., Bondt, A. and MacInnes, A.W. (2011) A zebrafish model of dyskeratosis congenita reveals hematopoietic stem cell formation failure resulting from ribosomal protein-mediated p53 stabilization. *Blood*, **118**, 5458-5465.
46. Amsterdam, A., Sadler, K.C., Lai, K., Farrington, S., Bronson, R.T., Lees, J.A. and Hopkins, N. (2004) Many ribosomal protein genes are cancer genes in zebrafish. *PLoS biology*, **2**, E139.
47. Heijnen, H.F., van Wijk, R., Pereboom, T.C., Goos, Y.J., Seinen, C.W., van Oirschot, B.A., van Dooren, R., Gastou, M., Giles, R.H., van Solinge, W. *et al.* (2014) Ribosomal protein mutations induce autophagy through S6 kinase inhibition of the insulin pathway. *PLoS genetics*, **10**, e1004371.
48. Hu, J., Liu, J., Xue, F., Halverson, G., Reid, M., Guo, A., Chen, L., Raza, A., Galili, N., Jaffray, J. *et al.* (2013) Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. *Blood*, **121**, 3246-3253.

49. Loughran, G., Howard, M.T., Firth, A.E. and Atkins, J.F. (2017) Avoidance of reporter assay distortions from fused dual reporters. *Rna*, **23**, 1285-1289.
50. Jacks, T., Power, M.D., Masiarz, F.R., Luciw, P.A., Barr, P.J. and Varmus, H.E. (1988) Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature*, **331**, 280-283.
51. Wilson, W., Braddock, M., Adams, S.E., Rathjen, P.D., Kingsman, S.M. and Kingsman, A.J. (1988) HIV expression strategies: ribosomal frameshifting is directed by a short sequence in both mammalian and yeast systems. *Cell*, **55**, 1159-1169.
52. Shigemoto, K., Brennan, J., Walls, E., Watson, C.J., Stott, D., Rigby, P.W. and Reith, A.D. (2001) Identification and characterisation of a developmentally regulated mammalian gene that utilises -1 programmed ribosomal frameshifting. *Nucleic acids research*, **29**, 4079-4088.
53. Manktelow, E., Shigemoto, K. and Brierley, I. (2005) Characterization of the frameshift signal of Edr, a mammalian example of programmed -1 ribosomal frameshifting. *Nucleic acids research*, **33**, 1553-1563.
54. Matsufuji, S., Matsufuji, T., Miyazaki, Y., Murakami, Y., Atkins, J.F., Gesteland, R.F. and Hayashi, S. (1995) Autoregulatory frameshifting in decoding mammalian ornithine decarboxylase antizyme. *Cell*, **80**, 51-60.
55. Penzo, M., Carnicelli, D., Montanaro, L. and Brigotti, M. (2016) A reconstituted cell-free assay for the evaluation of the intrinsic activity of purified human ribosomes. *Nature protocols*, **11**, 1309-1325.
56. Penzo, M., Rocchi, L., Brugiere, S., Carnicelli, D., Onofrillo, C., Coute, Y., Brigotti, M. and Montanaro, L. (2015) Human ribosomes from cells with reduced dyskerin levels are intrinsically altered in translation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **29**, 3472-3482.
57. Salvetti, A., Coute, Y., Epstein, A., Arata, L., Kraut, A., Navratil, V., Bouvet, P. and Greco, A. (2016) Nuclear Functions of Nucleolin through Global Proteomics and Interactomic Approaches. *Journal of proteome research*, **15**, 1659-1669.
58. Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Llinares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D.J., Inuganti, A., Griss, J., Mayer, G., Eisenacher, M. *et al.* (2019) The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic acids research*, **47**, D442-D450.
59. Voorhees, R.M., Fernandez, I.S., Scheres, S.H. and Hegde, R.S. (2014) Structure of the mammalian ribosome-Sec61 complex to 3.4 A resolution. *Cell*, **157**, 1632-1643.
60. Diets, I.J., Waanders, E., Ligtenberg, M.J., van Bladel, D.A.G., Kamping, E.J., Hoogerbrugge, P.M., Hopman, S., Olderode-Berends, M.J., Gerkes, E.H., Koolen, D.A. *et al.* (2018) High Yield of Pathogenic Germline Mutations Causative or Likely Causative of the Cancer Phenotype in Selected Children with Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **24**, 1594-1603.
61. Ball, S. (2011) Diamond Blackfan anemia. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, **2011**, 487-491.
62. Doherty, L., Sheen, M.R., Vlachos, A., Choesmel, V., O'Donohue, M.F., Clinton, C., Schneider, H.E., Sieff, C.A., Newburger, P.E., Ball, S.E. *et al.* (2010) Ribosomal protein genes RPS10 and RPS26 are commonly mutated in Diamond-Blackfan anemia. *American journal of human genetics*, **86**, 222-228.
63. Draptchinskaia, N., Gustavsson, P., Andersson, B., Pettersson, M., Willig, T.N., Dianzani, I., Ball, S., Tchernia, G., Klar, J., Matsson, H. *et al.* (1999) The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet*, **21**, 169-175.
64. Gamalinda, M., Ohmayer, U., Jakovljevic, J., Kumcuoglu, B., Woolford, J., Mbom, B., Lin, L. and Woolford, J.L., Jr. (2014) A hierarchical model for assembly of eukaryotic 60S ribosomal subunit domains. *Genes & development*, **28**, 198-210.
65. Amsterdam, A., Burgess, S., Golling, G., Chen, W., Sun, Z., Townsend, K., Farrington, S., Haldi, M. and Hopkins, N. (1999) A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish. *Genes & development*, **13**, 2713-2724.
66. Antunes, A.T., Goos, Y.J., Pereboom, T.C., Hermkens, D., Wlodarski, M.W., Da Costa, L. and MacInnes, A.W. (2015) Ribosomal Protein Mutations Result in Constitutive p53 Protein Degradation through Impairment of the AKT Pathway. *PLoS genetics*, **11**, e1005326.
67. Taylor, A.M., Humphries, J.M., White, R.M., Murphey, R.D., Burns, C.E. and Zon, L.I. (2012) Hematopoietic defects in rps29 mutant zebrafish depend upon p53 activation. *Experimental hematology*, **40**, 228-237 e225.

68. Lai, K., Amsterdam, A., Farrington, S., Bronson, R.T., Hopkins, N. and Lees, J.A. (2009) Many ribosomal protein mutations are associated with growth impairment and tumor predisposition in zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **238**, 76-85.
69. Boultwood, J., Pellagatti, A. and Wainscoat, J.S. (2012) Haploinsufficiency of ribosomal proteins and p53 activation in anemia: Diamond-Blackfan anemia and the 5q- syndrome. *Advances in biological regulation*, **52**, 196-203.
70. Chong, J. and Xia, J. (2018) MetaboAnalystR: an R package for flexible and reproducible analysis of metabolomics data. *Bioinformatics*, **34**, 4313-4314.
71. Graham, T.E. and MacLean, D.A. (1992) Ammonia and amino acid metabolism in human skeletal muscle during exercise. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, **70**, 132-141.
72. Rakauskaite, R. and Dinman, J.D. (2006) An arc of unpaired "hinge bases" facilitates information exchange among functional centers of the ribosome. *Molecular and cellular biology*, **26**, 8992-9002.
73. Itahana, Y. and Itahana, K. (2018) Emerging Roles of p53 Family Members in Glucose Metabolism. *International journal of molecular sciences*, **19**.
74. De Keersmaecker, K., Atak, Z.K., Li, N., Vicente, C., Patchett, S., Girardi, T., Gianfelici, V., Geerdens, E., Clappier, E., Porcu, M. *et al.* (2012) Exome sequencing identifies mutation in CNOT3 and ribosomal genes RPL5 and RPL10 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*.
75. Jamar, N.H., Kritsiligkou, P. and Grant, C.M. (2017) The non-stop decay mRNA surveillance pathway is required for oxidative stress tolerance. *Nucleic acids research*, **45**, 6881-6893.
76. Gutteridge, J.M. (1993) Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free radical research communications*, **19**, 141-158.

Table and Figure Legends

Table 1. Clinical features in individuals carrying variants in *RPL9*.

Figure 1. Heterozygous variants in *RPL9* are linked to human disease. A) Two pedigrees of individuals affected by DBA (left) or multiple cancer incidences (right). Affected variant carriers are indicated with filled squares (male) or circles (female) and are identified as Patients 1-3 (P1-4). Unaffected individuals are indicated by unfilled symbols. N/A indicates unaffected family members who were not investigated for the presence of variants. **B)** Sanger sequencing results of LCLs derived from heathy controls or the affected individuals in **(A)**. The double peaks illustrating variant allele expression are indicated with arrows. **C)** Schematic representation of the human *RPL9* gene depicting localization of the variants identified in the families in **(A)**.

Figure 2. Variants in *RPL9* recapitulate specific pre-rRNA processing defects found in RP depleted cells and show key differences. A) Northern blot analysis of LCLs derived from individuals carrying *RPL9* variants. Radio-labeled probes against ITS2 (left panels), ITS1-5.8S (upper right panels), or 5'ITS1 (middle panels), or 18S and 28S (lower right panels) rRNA sequences were used to blot 3µg total RNA isolated from cells. **B)** Quantification of three independent experiments analyzing rRNA precursors in LCLs derived from individuals carrying *RPL9* variants using RAMP.

Figure 3. Variants in *RPL9* confer different polysome profile peak ratios. A-C) Representative polysome profiles of LCLs derived from a healthy control (**A**), a DBA-affected individual (P1) carrying the *RPL9* c.-2+1 variant (**B**), and an individual (P2) carrying the uL6 p.Leu20Pro variant (**C**). or healthy controls. The 40S small subunit, 60S subunit, 80S monosome, and polysomes are labeled. The reduced 60S peaks in the profiles are indicated with open arrows, the reduced 80S monosomes indicated by filled arrows.

Figure 4. Zebrafish models of *rpl9* loss recapitulate the anemia phenotype of DBA. A) Morphology at 4 dpf of wild type embryos or hi1422 mutants that reduce levels of uL6 protein coded for by *rpl9.* White arrowheads indicate the failure of swim bladder inflation. **B)** Illustration of scoring embryos at 2 dpf stained with o-dianisidine as having a normal, moderate, or severe phenotype of hemoglobin-expressing cells. **C)** Scoring and genotypes of o-dianisidine stained embryos from clutches of hi1422 matings stained at 2 dpf.

Figure 5. Erythroid cell culture assays of primary CD34$^+$ cells reveal proliferation defects only in cells with 5'UTR variants. A) Growth curves of CD34$^+$ cells isolated from peripheral blood of the DBA-affected individual carrying the *RPL9* c.-2+1 variant (P1, red) compared to erythroid cells from a healthy control (blue). **B)** Western blotting of lysates from cells in (**A**) collected at Day 7 and probed with antibodies against uL6 protein. **C)** Growth curves of CD34$^+$ cells isolated from the individual carrying the uL6 (*RPL9*) p.Leu20Pro variant (P2, red) compared to cells from a healthy control (blue). **D)** Western blotting of lysates from cells in (**C**) collected at Day 7 and probed with antibodies against uL6 protein.

Figure 6. TP53 protein is stabilized in cells carrying the 5'UTR variant. **A)** Western blots of LCL lysates either treated for 6 hours with a DMSO vehicle control (-) or 100nM camptothecin (CPT, +) probed with antibodies against TP53. LCLs are derived from a healthy control, the DBA-affected individual carrying the *RPL9* c.-2+1 variant (P2), or two unrelated DBA-affected individuals carrying truncations in *RPL15* (21) **B)** Similar western blots as in (**A**) using LCLs derived from the individual carrying the uL6 (*RPL9*) p.Leu20Pro variant (P3).

Figure 7. Cells carrying the uL6 p.Leu20Pro variant reveal translational fidelity defects. A) Cell-based assay to measure UAG and UGA stop codon readthough using bicistronic luciferase reporters transfected in LCLs derived from individuals carrying the *RPL9* c.-2+1G>C variant (P2), the uL6 p.Leu20Pro variant (P3), or unrelated healthy controls. *p<0.05, **p<0.01. **B)** Cell-free assay measuring the level of UAG stop codon readthrough in ribosomes purified from LCLs carrying the *RPL9* c.-2+1G>C (P2) or uL6 p.Leu20Pro (P3) variant compared to LCLs from three unrelated healthy controls. Experiments were performed three times in

duplicate with two different preparations of ribosomes per cell type; error bars represent standard error. To determine statistical significance, a paired Student's t-test was applied. **p<0.01. **C)** MS-based proteomic characterization of ribosomes purified from LCLs of P2 carrying the uL6 p.Leu20Pro variant (N=3). Sequences and scores of peptides identified by Mascot search engine and covering the position 20 of uL6 are presented. On the *y*-axis the amino acid in position 20 of uL6 is in bold font and underlined. **D)** Quantification of the abundance of uL6 peptides carrying Pro20 or Leu20 measured in purified ribosomes from LCLs generated from a healthy control or P2. **E)** Predicted structure of uL6 p.Leu20Pro variant protein (in pink) superimposed on the known structure of wild type uL6 (in lime green). Helix 95 of the SRL is shown in gold, amino acid 20 (aa20) is shown in red, rRNA helix 97 is shown in cyan, rRNA extension segment 39 (ES39) is shown in light purple, eEF2 is shown in dark purple, and the positions of the Lys21 (wild type in lime green, variant in pink) are indicated with arrows.

Figure 8. Metabolic profiles and enrichment analysis of LCLs carrying *RPL9* variants. A) Metabolic profile heat map showing Z-scores of LCLs derived from 3 unrelated healthy controls compared to cells from DBA-affected individual (P1) carrying variants in the 5'UTR of *RPL9.* **B)** Metabolic profile heap map showing Z-scores of LCLs derived from 3 unrelated healthy controls compared to cells from an individual carrying the uL6 (*RPL9*) p.Leu20Pro variant (P2). For (**A**) and (**B**) only metabolites with comparative VIP-Scores >1 (out of 63 metabolites measured) are listed. **C)** Enrichment analysis (using Metabolanalyst 3.0 online software) of significantly changed metabolites from (**A**). **D)** Enrichment analysis of significantly changed metabolites from (**B**).

1

[1] Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Laboratory Genetic Metabolic Diseases, Amsterdam Gastroenterology and Metabolism, Meibergdreef 9, 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands.
[2] Laboratorio di Patologia Clinica, Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale and Centro di Ricerca Biomedica Applicata (CRBA), Policlinico Universitario di S. Orsola, Università di Bologna,Via Massarenti 9, 40138 Bologna, Italy.
[3] LBME, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31000 Toulouse, France.
[4] Department of Cell Biology and Molecular Genetics, University of Maryland, College Park, MD USA.
[5] INSERM UMR S1134, F-75015, Paris, France.
[6] Amsterdam UMC, University of Amsterdam, Laboratory Genetic Metabolic Diseases, Core Facility Metabolomics, Amsterdam Gastroenterology and Metabolism, Meibergdreef 9, 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands.
[7] Department of Human Genetics, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands.
[8] University Grenoble Alpes, CEA, INSERM, IRIG, BGE, F-38000 Grenoble, France
[9] Paris University, Paris, France.
[10] Laboratory of Excellence for Red Cell, LABEX GR-Ex, F-75015, Paris, France.
[11] Institute Gustave Roussy, Inserm unit U1170, F-94800 Villejuif, France.
[12] Department of Comparative Pathobiology, Purdue University, West Lafayette, Indiana 47907, USA.
[13] Department of Pathology, University Medical Center Utrecht, 3584 CX Utrecht, The Netherlands.
[14] (Current affiliation) University Medical Center Groningen, 9713 GZ Groningen, The Netherlands
[15] Department of Genetics, University Medical Center Utrecht, 3508 AB Utrecht, The Netherlands.
[16] Princess Maxima Center for Pediatric Oncology, Utrecht, The Netherlands.
[17] Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Division of Pediatric Hematology and Oncology, Medical Center, Faculty of Medicine, University of Freiburg, D-79106 Freiburg, Germany.
[18] St. Jude's Children Research Hospital, Memphis, TN, USA.
[19] Department of Pediatrics, Universitair Ziekenhuis Brussel, Brussels, Belgium.

[20] Pediatric Hematology/Oncology Service, Robert Debré Hospital, F-75019, Paris, France.
[21] Hematology Lab, Robert Dubré Hospital, F-75019, Paris, France.
22 (Current affiliation) Philips Research, Department of Precision Diagnostics, 5656 AE Eindhoven, The Netherlands
* Equal contribution
Corresponding author: alyson.macinnes@philips.com

Figure 1

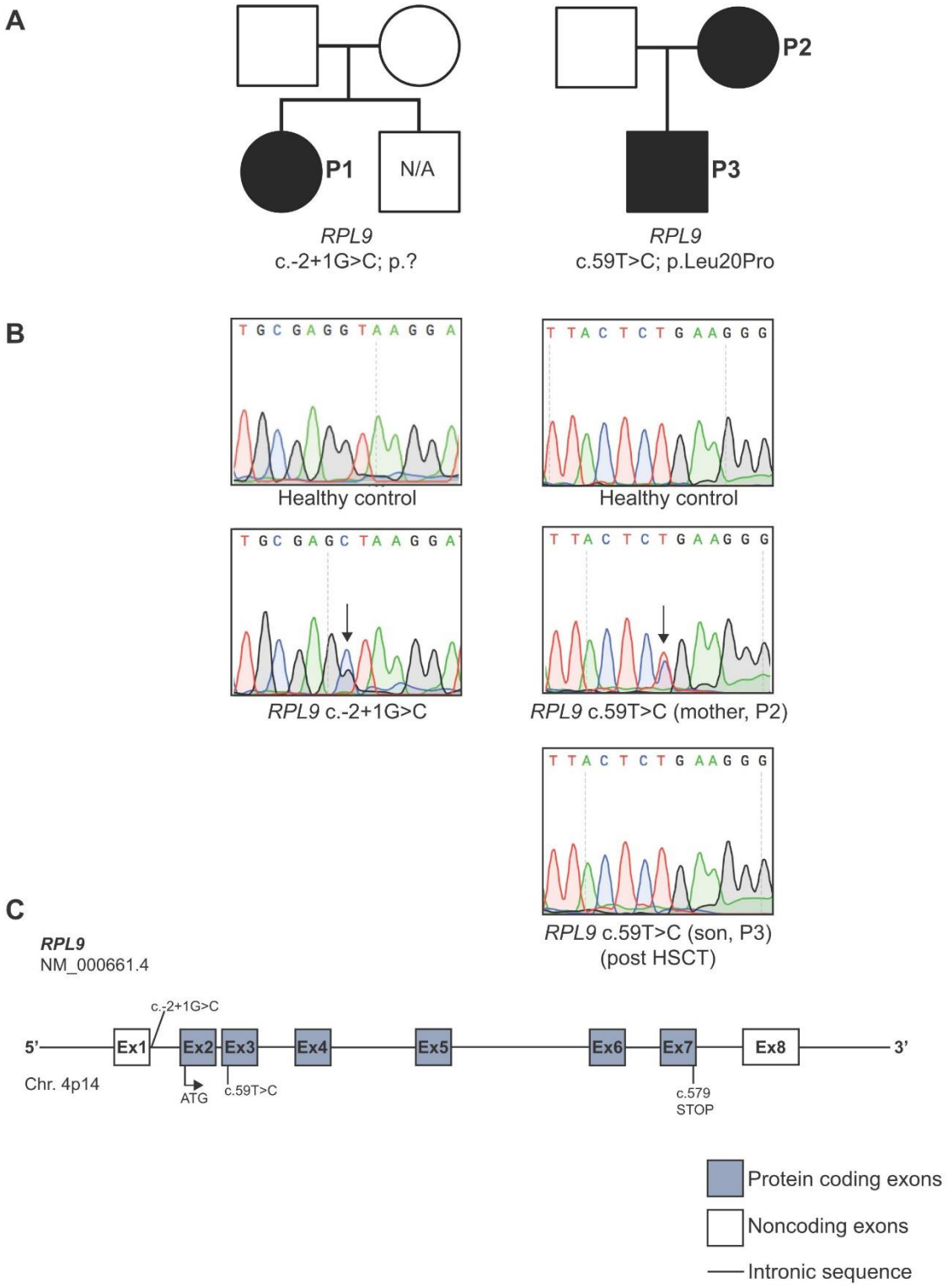

A
P1
N/A
P2
P3
RPL9
c.-2+1G>C; p.?
RPL9
c.59T>C; p.Leu20Pro
B
T G C G A G G T A A G G A
Healthy control
T T A C T C T G A A G G G
Healthy control
T G C G A G C T A A G G A
RPL9 c.-2+1G>C
T T A C T C T G A A G G G
RPL9 c.59T>C (mother, P2)
T T A C T C T G A A G G G
RPL9 c.59T>C (son, P3)
(post HSCT)
C
RPL9
NM_000661.4
c.-2+1G>C
5'
Ex1
Ex2
Ex3
Ex4
Ex5
Ex6
Ex7
Ex8
3'
Chr. 4p14
ATG
c.59T>C
c.579
STOP
Protein coding exons
Noncoding exons
Intronic sequence

Figure 2

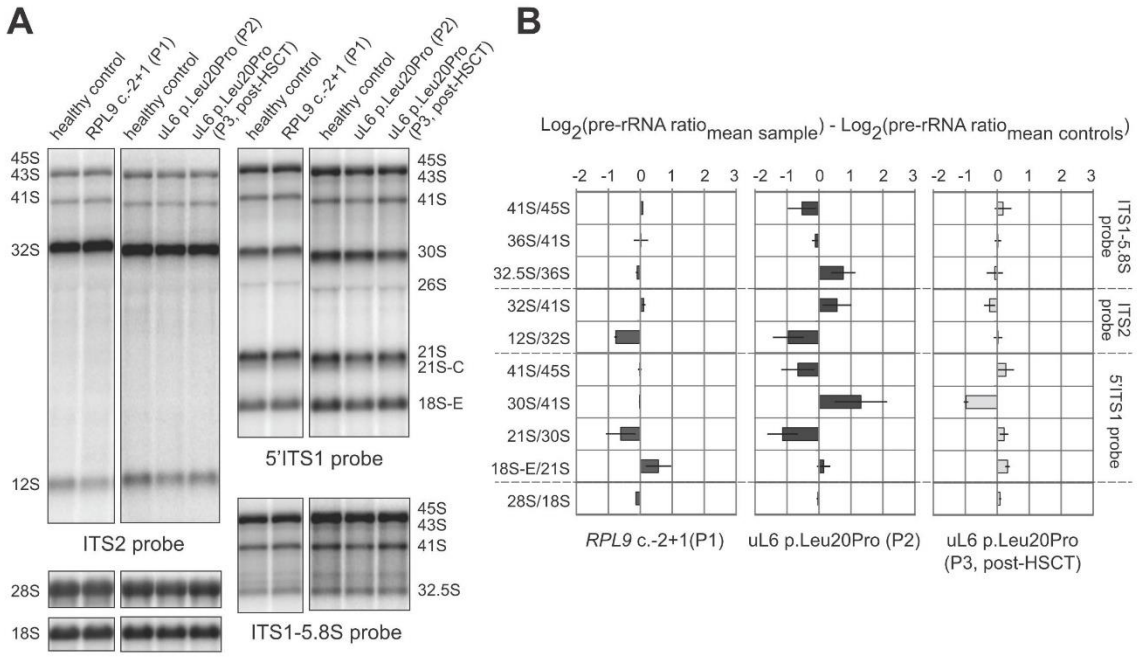


Figure 3

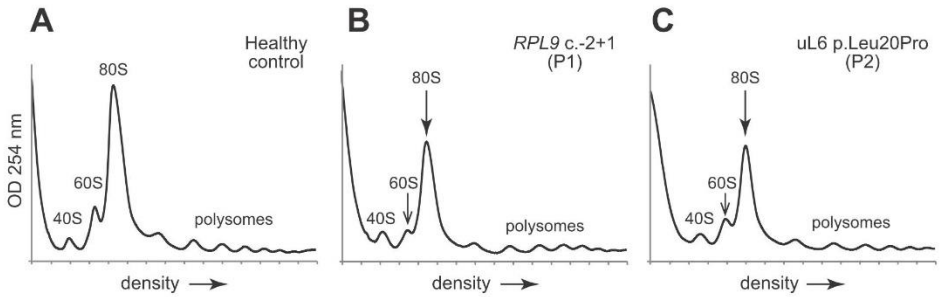


Figure 4

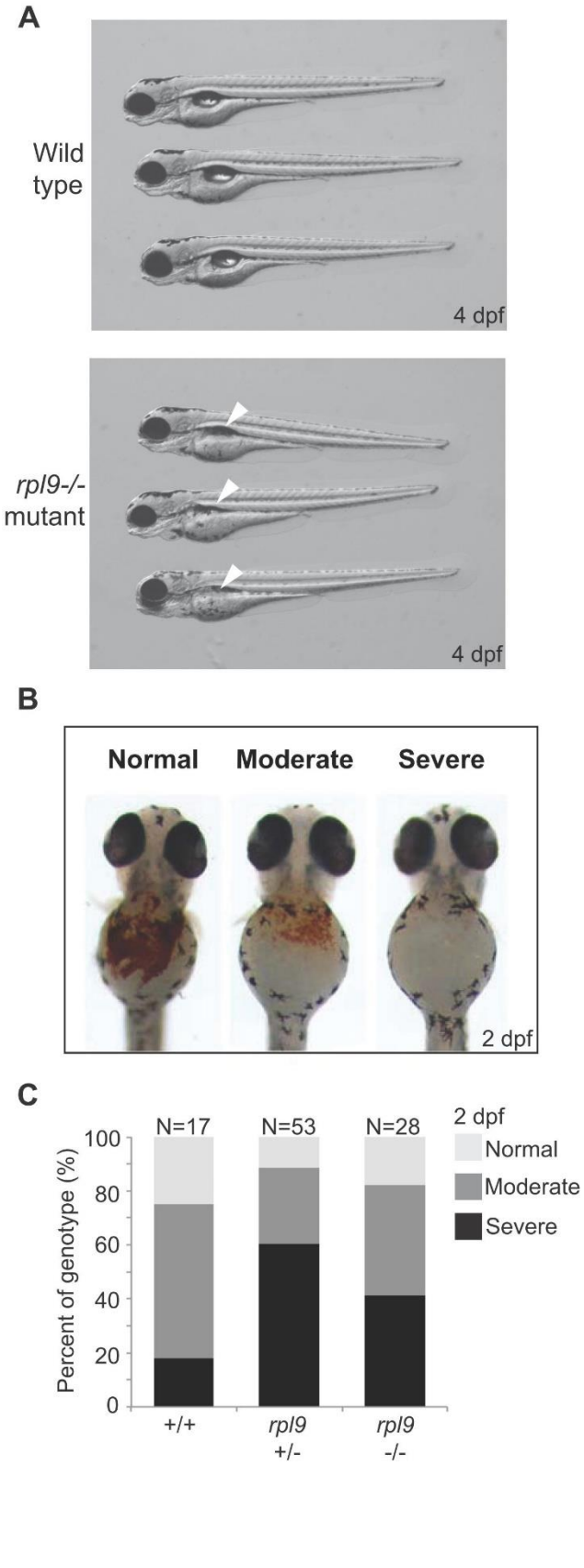

A
Wild type
4 dpf
rpl9-/- mutant
4 dpf
B
Normal
Moderate
Severe
2 dpf
C
N=17
N=53
N=28
2 dpf
Normal
Moderate
Severe
Percent of genotype (%)
100
80
60
40
20
0
+/+
rpl9 +/-
rpl9 -/-

Figure 5

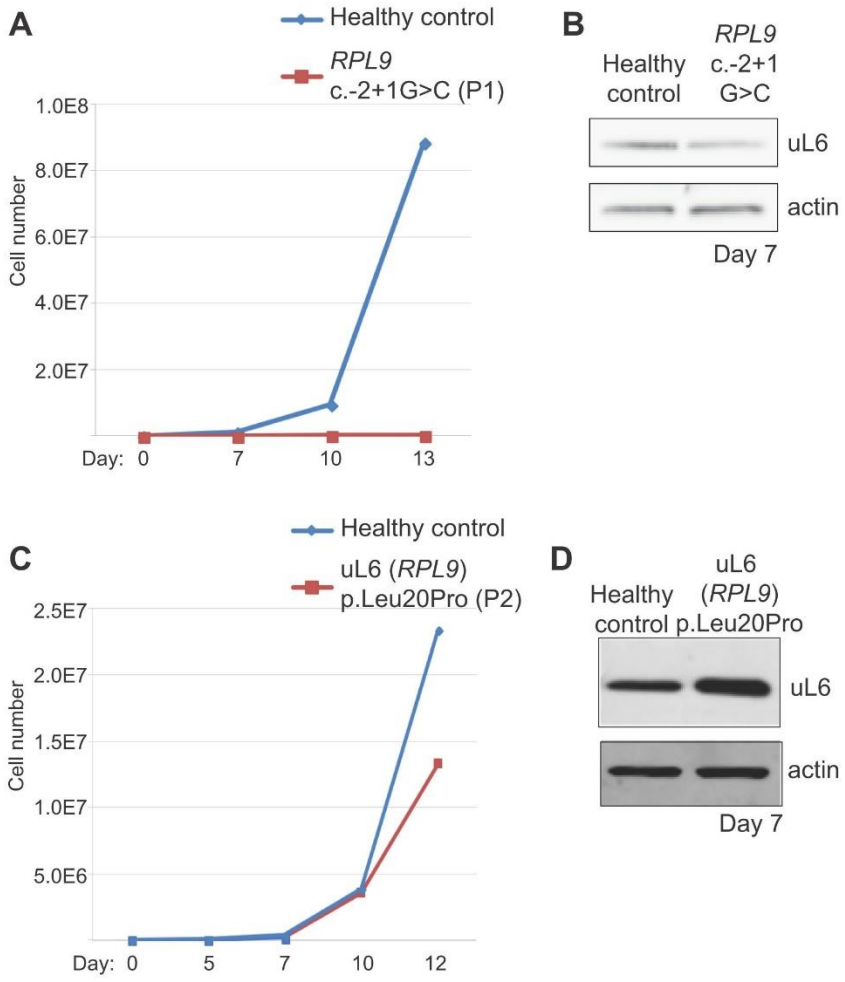


Figure 6

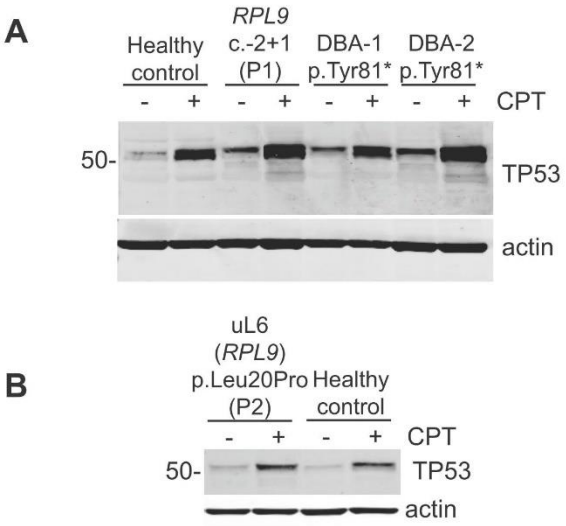


Figure 7

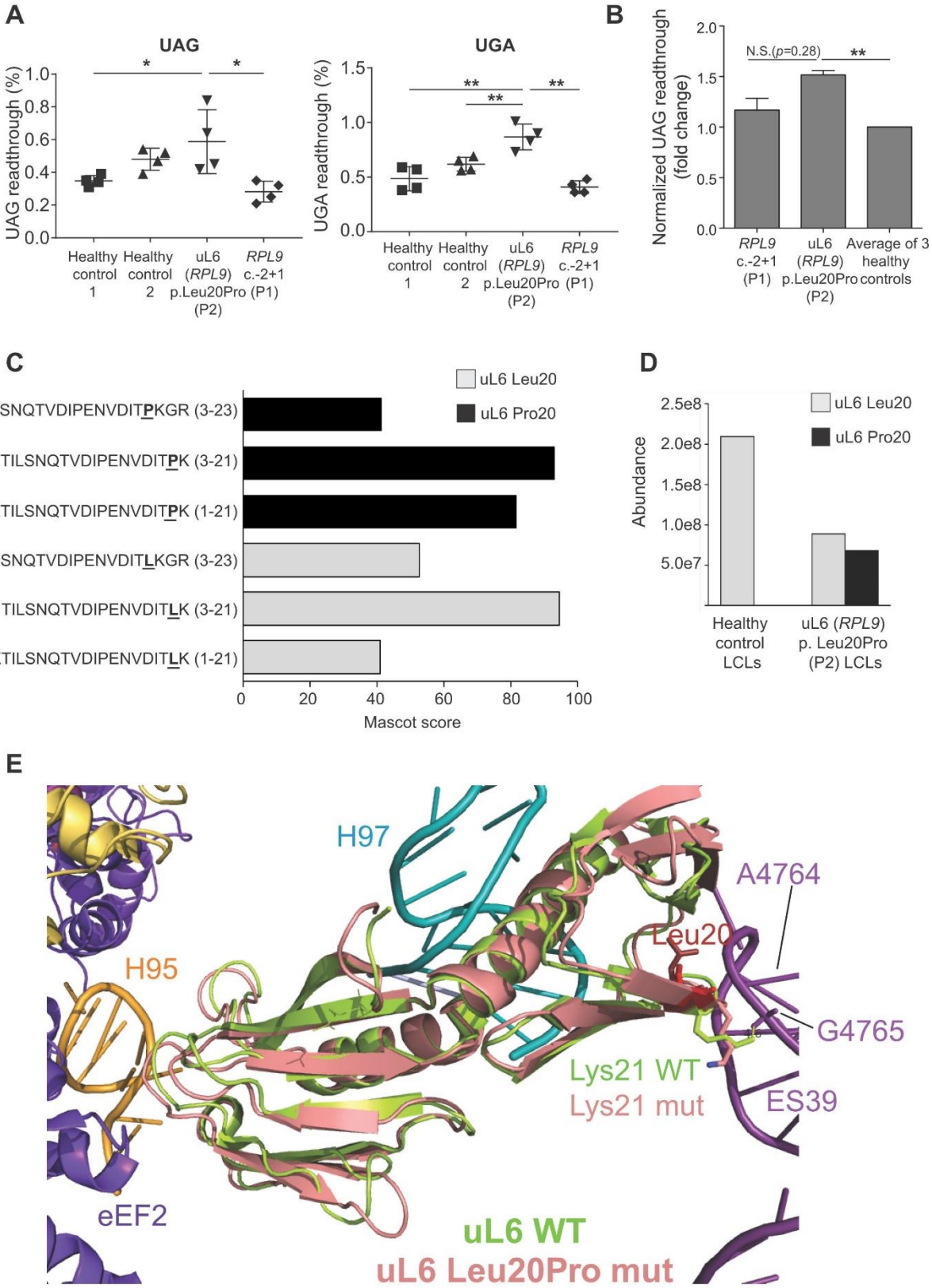
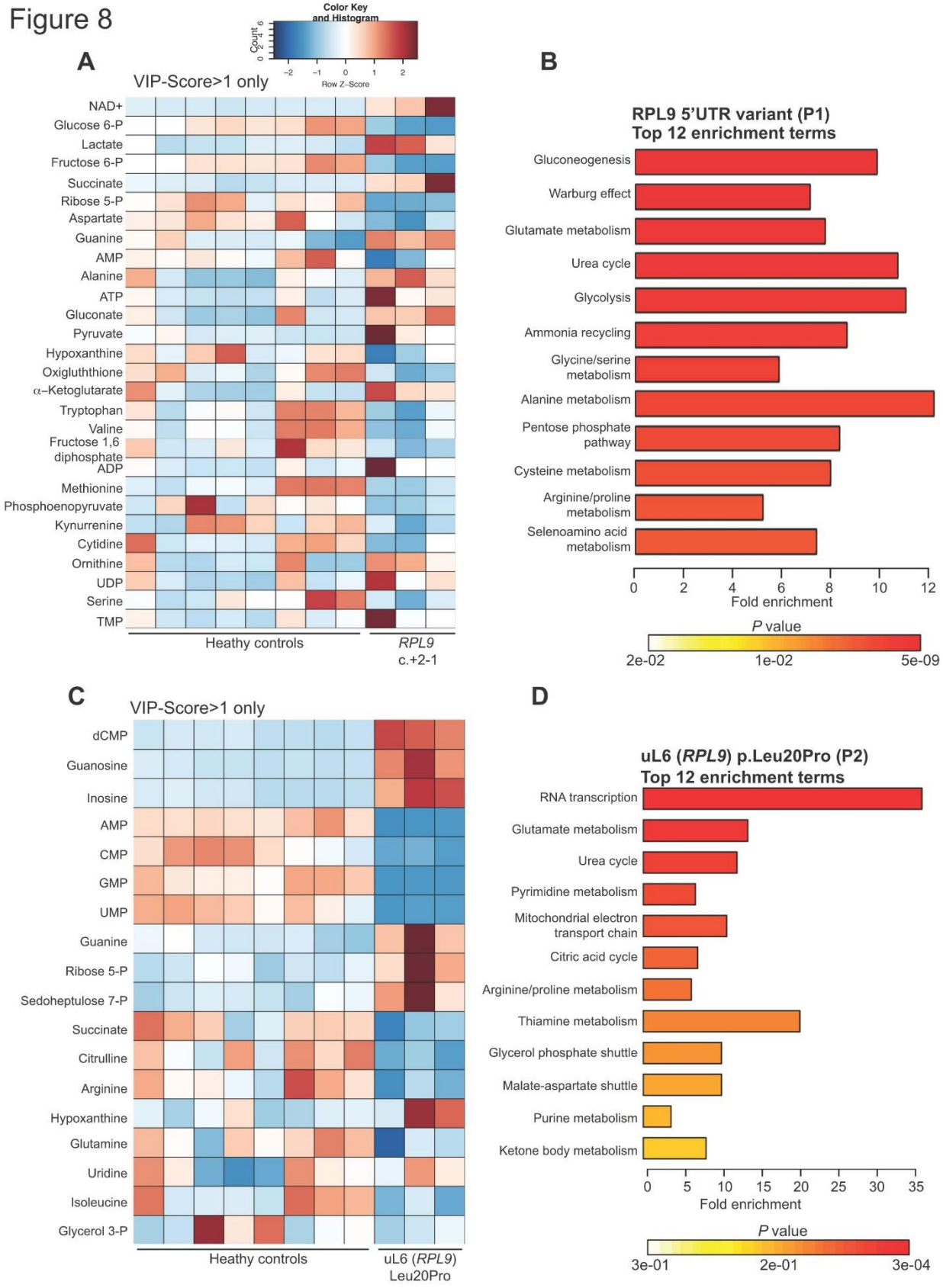

A
UAG
UGA
UAG readthrough (%)
UGA readthrough (%)
Healthy control 1
Healthy control 2
uL6 (RPL9) p.Leu20Pro (P2)
RPL9 c.-2+1 (P1)
B
Normalized UAG readthrough (fold change)
N.S.(p=0.28)
RPL9 c.-2+1 (P1)
uL6 (RPL9) p.Leu20Pro (P2)
Average of 3 healthy controls
C
uL6 Leu20
uL6 Pro20
TILSNQTVDIPENVDITPKGR (3-23)
TILSNQTVDIPENVDITPK (3-21)
MKTILSNQTVDIPENVDITPK (1-21)
TILSNQTVDIPENVDITLKGR (3-23)
TILSNQTVDIPENVDITLK (3-21)
MKTILSNQTVDIPENVDITLK (1-21)
Mascot score
D
Abundance
Healthy control LCLs
uL6 (RPL9) p. Leu20Pro (P2) LCLs
E
H97
A4764
Leu20
H95
G4765
Lys21 WT
Lys21 mut
ES39
eEF2
uL6 WT
uL6 Leu20Pro mut

Figure 8


A
Color Key and Histogram
Count
Row Z-Score
VIP-Score>1 only
NAD+
Glucose 6-P
Lactate
Fructose 6-P
Succinate
Ribose 5-P
Aspartate
Guanine
AMP
Alanine
ATP
Gluconate
Pyruvate
Hypoxanthine
Oxigluthione
α-Ketoglutarate
Tryptophan
Valine
Fructose 1,6 diphosphate
ADP
Methionine
Phosphoenopyruvate
Kynurrenine
Cytidine
Ornithine
UDP
Serine
TMP
Heathy controls
RPL9 c.+2-1
B
RPL9 5'UTR variant (P1)
Top 12 enrichment terms
Gluconeogenesis
Warburg effect
Glutamate metabolism
Urea cycle
Glycolysis
Ammonia recycling
Glycine/serine metabolism
Alanine metabolism
Pentose phosphate pathway
Cysteine metabolism
Arginine/proline metabolism
Selenoamino acid metabolism
Fold enrichment
P value
2e-02
1e-02
5e-09
C
VIP-Score>1 only
dCMP
Guanosine
Inosine
AMP
CMP
GMP
UMP
Guanine
Ribose 5-P
Sedoheptulose 7-P
Succinate
Citrulline
Arginine
Hypoxanthine
Glutamine
Uridine
Isoleucine
Glycerol 3-P
Heathy controls
uL6 (RPL9) Leu20Pro
D
uL6 (RPL9) p.Leu20Pro (P2)
Top 12 enrichment terms
RNA transcription
Glutamate metabolism
Urea cycle
Pyrimidine metabolism
Mitochondrial electron transport chain
Citric acid cycle
Arginine/proline metabolism
Thiamine metabolism
Glycerol phosphate shuttle
Malate-aspartate shuttle
Purine metabolism
Ketone body metabolism
Fold enrichment
P value
3e-01
2e-01
3e-04

B. Variations alléliques du gène RPL13

1. Contexte scientifique

Forts de l'identification du rôle de certains variants de gène de RP non seulement dans l'ABD mais également dans d'autres pathologies, nous avons été contactés par une équipe nantaise pour étudier le défaut de l'érythropoïèse chez des patients qui présentaient un syndrome clinique musculosquelettique. L'idée était de vérifier la présence ou non d'un défaut secondaire de l'érythropoïèse chez ces patients et qui pouvait en faire des phénotypes particuliers de l'ABD. Cette seconde étude présentée porte donc sur des variants *de novo* du gène *RPL13* identifiés lors d'un séquençage d'exome chez des individus non apparentés atteints d'une dysplasie spondyloépimétaphysaire sévère partageant des caractéristiques cliniques et radiologiques communes. Ces anomalies correspondent à une entité rare décrite pour la première fois il y a quelques années. La protéine RPL13 est essentielle à l'assemblage ribosomique puisque son absence entraîne l'arrêt de la maturation à un stade précoce de l'assemblage du ribosome. Jusqu'à présent, les mutations de gènes codant pour des protéines ribosomiques n'ont été décrites que dans un ensemble restreint de pathologies tant congenitales qu'acquises : l'Anémie de Blackfan-Diamond, l'asplénie congénitale isolée, le syndrome autistique et la prédisposition à un carcinome colorectal non polyposis héréditaire. Dans ce travail collaboratif, nous décrivons ici la première ribosomopathie squelettique humaine liée à la protéine RPL13 soulignant le rôle des RP dans le développement osseux.

2. Résultats

Tous les patients présentent une petite taille, des anomalies épimétaphysaires et platysphondynies (aplatissement congénital du corps vertébral) mais ne présentent aucune anomalie hématologique dans la numération globulaire. Chaque patient possède un site d'épissage de *RPL13* altéré (variation *de novo*) ou un variant faux-sens conduisant à un ARNm anormal c.477+1G>T, c.477+1G>A, and c.477+2T>C. Le knock-down de RPL13 par des siARNs dans des cellules HeLa induit une altération de la maturation des ARNr. Cependant, les données obtenues montrent que la maturation des pré-ARNr ne semble pas être affectée dans les cellules des patients. En outre, les protéines RPL13 mutantes sont incorporées dans les ribosomes dans la même mesure que les RPL13 sauvages. Les variants RPL13 ne sont pas

responsables d'une diminution de la biogenèse des ribosomes. La modélisation réalisée suggère que l'insertion du polypeptide 18 induit l'élimination d'une importante interaction type protéine-ARN entre la protéine RPL13 et l'ARNr 28S

De notre côté, nous avons pu montrer dans les cultures érythroïdes des cellules $CD34^+$ isolées du sang périphérique de patients porteurs de variation allélique de RPL13, une diminution du nombre de cellules au cours de la différenciation érythroïde terminale (stade des érythroblastes orthochromatophiles) tout en étant normal aux stades des progéniteurs, précurseurs proérythroblastes et basophiles. Aucun impact sur la viabilité cellulaire n'a été observé mais une diminution de l'amplification cellulaire a été identifiée entre les jours 10 et 15 de la culture. L'étude de la différenciation érythroïde en CMF à différents jours correspondant à différents stades de l'érythropoïèse (voir protocole) ne montre aucune différence entre le patient et le témoin sain. L'apparition des différents marqueurs est normale pour les deux échantillons.

Enfin, l'évaluation du profil d'expression de RPL13 dans la plaque de croissance osseuse via des coupes transversales de plaques de croissance chez des souris saines a été analysée par immunohistochimie. Les données suggèrent que la protéine RPL13 est principalement exprimée dans la zone hypertrophique et la zone remodelante ainsi que légèrement dans les cellules situées au sein du compartiment de la moelle osseuse. Cette localisation peut être dûe à un rôle spécifique de RPL13 dans la traduction des ARNm au sein des chondrocytes et/ou les ostéoblastes de la plaque de croissance.

3. Conclusion

Cette nouvelle ribosomopathie pourrait affecter le développement osseux en diminuant le niveau de traduction dans les cellules de la plaque de croissance comme le montre la lignée érythroïde. De futures études seraient nécessaires pour élucider l'impact spécifique de ces variants de RPL13 sur la traduction des facteurs clés de la plaque de croissance. Cependant, cette étude permet de mettre en évidence l'impact d'une nouvelle protéine ribosomique dans une pathologie que nous pouvons caractériser de ribosomopathie, et qui sans être responsable d'ABD proprement dit entraîne malgré tout un défaut de prolifération au stade tardif de l'érythropoïèse que l'on explique mal compte tenu de l'absence d'anémie chez ces patients.

Ces résultats soulignent l'élargissement du paysage des phénotypes cliniques et biologiques associées aux variants génétiques des RP.

Article publié dans Am J Hum Genet le 24/09/2019

REPORT

RPL13 Variants Cause Spondyloepimetaphyseal Dysplasia with Severe Short Stature

Cedric Le Caignec,[1,21] Benjamin Ory,[2,21] François Lamoureux,[2,21] Marie-Francoise O'Donohue,[3] Emilien Orgebin,[2] Pierre Lindenbaum,[4] Stéphane Téletchéa,[5] Manon Saby,[6] Anna Hurst,[7] Katherine Nelson,[7] Shawn R. Gilbert,[8] Yael Wilnai,[9] Leonid Zeitlin,[10] Eitan Segev,[10] Robel Tesfaye,[2] Mathilde Nizon,[1] Benjamin Cogne,[1] Stéphane Bezieau,[1] Loic Geoffroy,[11] Antoine Hamel,[11] Emmanuelle Mayrargue,[11] Benoît de Courtivron,[12] Aliette Decock-Giraudaud,[13] Céline Charrier,[2] Olivier Pichon,[1] Christelle Retière,[14,15] Richard Redon,[4] Alexander Pepler,[16] Kirsty McWalter,[17] Lydie Da Costa,[6,18] Annick Toutain,[19] Pierre-Emmanuel Gleizes,[3,22] Marc Baud'huin,[20,22,*] and Bertrand Isidor[1,22,*]

Variants in genes encoding ribosomal proteins have thus far been associated with Diamond-Blackfan anemia, a rare inherited bone marrow failure, and isolated congenital asplenia. Here, we report one de novo missense variant and three de novo splice variants in RPL13, which encodes ribosomal protein RPL13 (also called eL13), in four unrelated individuals with a rare bone dysplasia causing severe short stature. The three splice variants (c.477þ1G>T, c.477þ1G>A, and c.477þ2T>C) result in partial intron retention, which leads to an 18-amino acid insertion. In contrast to observations from Diamond-Blackfan anemia, we detected no evidence of signif cant pre-rRNA processing disturbance in cells derived from two affected individuals. Consistently, we showed that the insertion-containing protein is stably expressed and incorporated into 60S subunits similar to the wild-type protein. Erythroid proliferation in culture and ribosome prof le on sucrose gradient are modif ed, suggesting a change in translation dynamics. We also provide evidence that RPL13 is present at high levels in chondrocytes and osteoblasts in mouse growth plates. Taken together, we show that the identif ed RPL13 variants cause a human ribosomopathy def ned by a rare skeletal dysplasia, and we highlight the role of this ribosomal protein in bone development.

Because ribosomes translate mRNAs, they are universally responsible for the quality and quantity of proteins in all cells. Their production is highly regulated by many cellular processes, including growth, proliferation, and differentiation.[1] Assembly of the 80 ribosomal proteins (RPs) and four ribosomal RNAs (rRNAs) that form the two ribosomal subunits involve hundreds of ribosome biogenesis factors (RBFs). Variants in genes encoding RPs or RBFs have been linked to a growing class of genetic conditions called ribosomopathies. These conditions often include inherited bone marrow failure (IMBF), but various other tissues are affected, such as bones, spleen, pancreas, and heart.[2] Variants in genes encoding RPs have been described in a restricted set of congenital pathologies: Diamond-Blackfan anemia (DBA; >20 different RP genes [MIM: 105650]), isolated congenital asplenia (ICA [MIM: 271400], RPSA),[3] an autism syndrome (MIM: 617412) (RPS23),[4] and predisposition to hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (MIM: 120435) (RPS20).[5] DBA is described as a pure red-cell aplasia, while ICA is characterized by absence of the spleen without any other developmental defect. How variants in ubiquitously expressed genes can yield such tissue-specif c phenotypes remains an open question.

We report four unrelated individuals affected by a severe spondyloepimetaphyseal dysplasia (SEMD) which was f rst described in 2013.[6] The clinical and radiological abnormalities observed in these individuals are summarized in Table S1. Individuals 1 and 2 were reported as having a rare form of SEMD[6] which is similar to SEMD matrilin-3 related (MIM: 608728) and SEMD Strudwick type (MIM: 184250). All individuals shared common major features: normal birth length, early postnatal growth def - ciency, severe short stature, and genu varum. Skeletal radiographies showed platyspondyly and severe epiphyseal

[1]CHU Nantes, Service de génétique médicale, F-44000 Nantes, France; [2]Nantes Université, INSERM, Bone sarcomas and remodeling of calcif ed tissues, UMR 1238, F-44000 Nantes, France; [3]Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, UPS, CNRS, 31062 Toulouse, France; [4]L'institut du thorax, INSERM, CNRS, Université de Nantes, F-44000 Nantes, France; [5]Nantes Université, CNRS, Unité Fonctionnalité et Ingénierie des Protéines (UFIP), UMR CNRS 6286, F-44000 Nantes, France; [6]INSERM U1149/ERL 8252, Inf ammation Research Center, 75018 Paris, France; [7]Department of Genetics, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35233, USA; [8]Children's of Alabama, Department of Orthopaedic Surgery, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35233, USA; [9]Genetic Institute, Tel Aviv Sourasky Medical Center, Tel Aviv 6423906, Israel; [10]Pediatric Orthopedic Department, Dana-Dwek Children's Hospital, Tel Aviv Sourasky Medical Center, Tel Aviv 6423906, Israel; [11]Service d'Orthopédie Pédiatrique, CHU de Nantes, F-44000 Nantes, France; [12]Service de Chirurgie Orthopédique Pédiatrique, CHU de Tours, 37044 Tours, France; [13]CRB/Tumorothèque, CHU de Tours, 37044 Tours, France; [14]Etablissement Français du Sang, F-44000 Nantes, France; [15]CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, F-44000 Nantes, France; [16]Center for Genomics and Transcriptomics and Praxis für Humangenetik Tübingen, 72076 Tübingen, Germany; [17]GeneDx, Gaithersburg, MD 20877, USA; [18]AP-HP, Service d'Hématologie Biologique, Hôpital R. Debré, Université Paris 7 Denis Diderot, Sorbonne Paris Cité, 75019 Paris, France; [19]Service de Génétique, CHU de Tours, 37044 Tours, France; [20]Nantes Université, CHU Nantes, INSERM, Bone sarcomas and remodeling of calcif ed tissues, UMR 1238, F-44000 Nantes, France
[21]These authors contributed equally to this work
[22]These authors contributed equally to this work
*Correspondence: marc.baudhuin@univ-nantes.fr (M.B.), bertrand.isidor@chu-nantes.fr (B.I.)
https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.09.024.
Ó 2019 American Society of Human Genetics.

Table 1. Clinical and Radiological Observation in Affected Individuals

-	P1	P2	P3	P4
RPL13 variant (NM_000977.3)	c.477þ1G>T	c.477þ2T>C	c.477þ1G>A	c.548G>C
DNA (RefSeq accession number: NC_000016.9, ref GRCh37.p13)	g.89628800 G>T	g.89628801 T>C	g.89628800 G>A	g.89629362 G>C
Protein (RefSeq: NP_000968.2)	p.Asn159_Val160ins18	p.Asn159_Val160ins18	p.Asn159_Val160ins18	p.Arg183Pro
ExAC/gnomAD frequency	absent	absent	absent	absent
Mode of inheritance	de novo	de novo	de novo	de novo
Method of variant detection	ES trio	ES trio	ES trio	ES trio
Gender	M	M	M	F
Skeletal Findings				
Prenatal length < 2SD	-	-	-	-
Short stature	þþþ	þþþ	þþþ	þ
Genu varum	þ	þ	þ	þ
Scoliosis	-	þ	-	-
Hyperlaxity	-	-	-	-
Extraskeletal Findings				
Cone-rod dystrophy	-	-	-	-
Myopia	-	-	-	-
Deafness	-	-	-	-
Anemia	-	-	-	-
Radiological Findings				
Platyspondyly	þ	þ	þ	þ
Bowed femora			þ	þ
Shortened long bones	þ	þ	þ	þ
Metaphyseal involvement	þ	þ	þ	þ
Lower limbs epiphyseal changes	þ	þ	þ	þ
Upper limbs epiphyseal changes	-	-	þ	-
Pelvis				
Coxa vara	þ	þ	þ	þ
Hands				
Short phalanges	-	-	-	-

and metaphyseal changes in lower limbs. None of the individuals presented any episodes of anemia, and they all had a normal blood count at last follow-up.

Through trio exome sequencing of individuals P1 and P2 and their parents, we identified two de novo intronic single-nucleotide variants in RPL13 (NM_000977.3, [MIM: 113703]): c.477þ1G>T in individual P1 and c.477þ2T>C in individual P2 (Table 1). These variants are absent in public variant databases (dbSNP138, 1000 Genomes, NHLBI GO Exome Sequencing Project, gnomAD). Through GeneMatcher,[7] we subsequently identified two additional individuals (P3 and P4) with RPL13 variants (c.477þ1G>A and c.548G>C [p.Arg183Pro]); we also identified these variants through the use of trio-based exome sequencing. Both individuals were followed for short stature with SEMD (Figure 1A).

To confirm the pathological effect of the c.477þ1G>T and c.477þ2T>C variants, we performed RT-PCR on RNA isolated from peripheral blood samples from individuals P1 and P2. cDNA was used as a template for PCR using primers (Table 1). Agarose gel electrophoresis using cDNA showed an aberrant longer fragment amplified in both individuals, in addition to the normal 695 bp amplification product observed with control cDNA (Figure 1B, left panel).

Sanger sequencing of the aberrant amplified products revealed the presence of the first 54 bp of intron 5 (Figure 1C). These results confirmed that the intronic

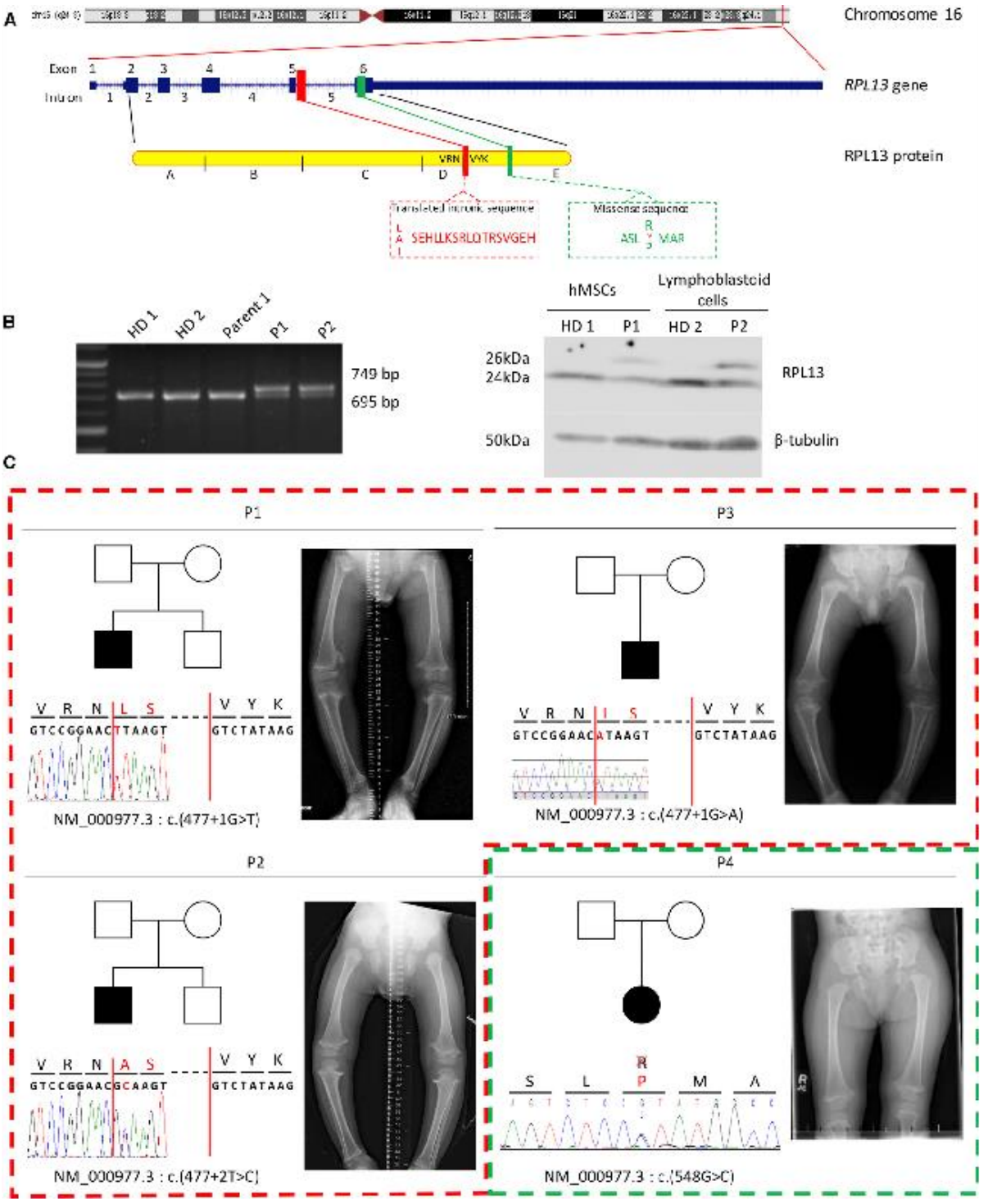


Figure 1. Mapping and Localization of the RPL13 (eL13) Variants Observed in Four Individuals
(A) Schematic representation of the gene RPL13 located in 16q24.3 region and its protein with the site of variants in the intron 5.
(B) Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of RPL13 mRNA from two healthy donors, one parent, P1, and P2 (left panel). Western blot analysis of cell lysates from MSCs or lymphoblastoid cells from healthy donors (HD), P1, and P2 illustrating the presence of the variant protein RPL13, 2kDa larger than the wild type protein. b-tubulin was used as loading control (right panel).
(C) Pedigree drawings, intragenic variants of RPL13 revealed by Sanger and X-Rays photographs of individuals at the ages (respectively) of 4 years and 4 months (P1), 3 years and 4 months (P2), 4 years (P3), and 2 years and 10 months (P4) showing shortened long bones, bowed femora with metaphyseal enlargement, and irregularities.

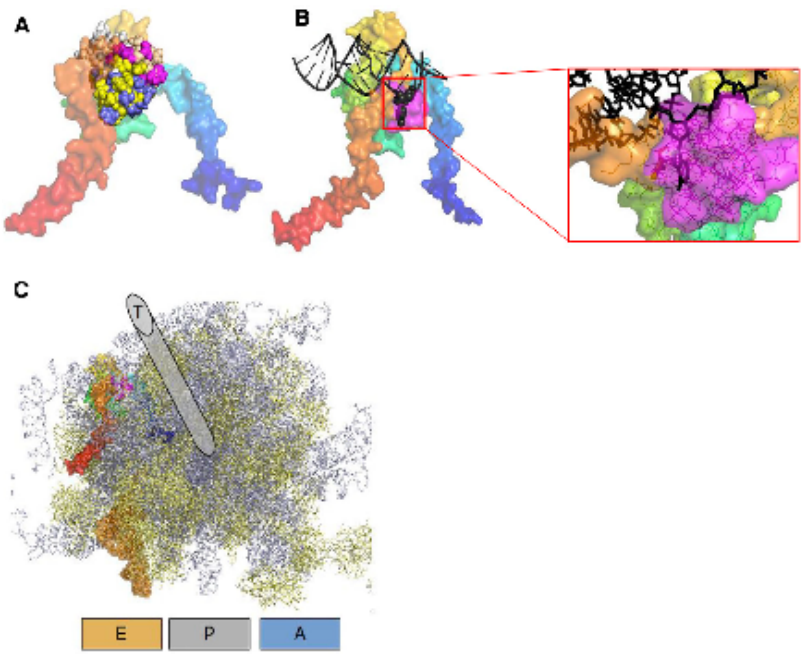


Figure 2. Structural Consequences of the Polypeptide Insertion on RPL13 and Ribosomal Architecture
(A) The U-shaped RPL13 structure in surface representation is colored from the N-terminal in blue to the C-terminal in red. The polypeptide insertion introduce a compact patch displayed in sphere representation (model 1, magenta; model 2, yellow; model 3, tan; model 4, white; model 5, blue).
(B) The insertion for model 1 (magenta surface) would induce a steric clash with Adenine 509 (in sphere representation) of the 28S RNA (black) in its ES7L region.
(C) General organization of the ribosome including the variant RPL13 protein. The 40S subunit is removed for clarity, 60S proteins are indicated in yellow, 60S RNAs are indicated in gray. Letters A, P, and E allow approximatively location of the aminacyl, the peptidyl, and the exit sites. The tRNA found in the deposited structure at the exit site is displayed in orange surface. The polypeptidic exit tunnel (T) is indicated above the picture although its exact location is more buried in the ribosome structure.

missense variants abolish the natural donor splice-site of intron 5 and demonstrated that a cryptic new donor splice located in intron 5 of RPL13 was utilized in individuals P1 and P2. This leads to an abnormal mRNA containing 54 bp of intron 5. Translation of this abnormal mRNA is expected to encode a 229-amino-acid protein containing the 18 supplementary amino acids. The fourth c.548G>C variant was conf rmed by Sanger sequencing and was de novo. It leads to the substitution of arginine 183 by a proline, which is expected to break the long alpha-helix present at the C terminus of the protein. The arginine 183 is highly conserved throughout species (PhastCons score 1, Mutation Taster[8]). This variant is also absent from all genomic databases and is predicted to be pathogenic (score 0.966 [PolyPhen[9]], PHRED score 26.0 [CADD[10]], score 106 [Mutation Taster]).

At the protein level, western blot analysis carried out on protein lysates from mesenchymal stem cells (MSCs, individual P1) and from lymphoblastoid cells (individual P2) conf rmed RT-PCR data. Two bands (24kDa and 26kDa) were detected for the two individuals, and only one band was detected in control cells (Figure 1B, right panel). The two bands differed by 2kDa, corresponding to an 18-residue peptide coded by the f rst 54 bp of intron 5.

To assess the putative consequences of RPL13 variants on the ribosome structure, the 18-residue-long (individuals P1, P2, and P3) peptide was inserted into the RPL13 sequence and submitted to I-TASSER for structure prediction. The f rst model obtained had a TM-Score of 0.44,[11] which is indicative of a high conf dence in the models. All f ve predicted models are very similar, with a root-mean-square deviation (RMSD) between them less than 2 Å to the native RPL13 fold. The 18-residue-long polypeptide addition is modeled as a compact structure conserving the U-shaped RPL architecture (Figure 2A). In the human ribosome structure, RPL13 is in contact with Expansion Segment 7L (ES7L) of the 28S RNA around positions 500–530 (complementary strand: 630–660). A direct interaction between adenine 509 and RPL13 tyrosine 161 is clearly observed in the deposited 4V6X structure, with the adenine extruded from the double-stranded DNA. The additional polypeptide insertion, as modeled in our study, would introduce steric clashes with the DNA at that position, thus preventing this specif c interaction (Figures 2B and 2C). This polypeptide patch seems nevertheless compatible with a merely intact ribosome structure because RPL13 presents an extended contact zone at the surface of the ribosome, close to the tRNA exit site (Figure 2D).

To investigate the functional consequences of RPL13 variants on ribosome biogenesis, we f rst assessed their impact on pre-rRNA processing by comparison with cells depleted of RPL13. As shown in Figure 3A, knockdown of RPL13 with siRNAs in HeLa cells severely affected the pre-rRNA pattern detected by northern blot. The most conspicuous effect was a defect in pre-rRNA cleavage at site 2 in ITS1, as revealed by the accumulation of 41S pre-rRNA relative to the 30S and 21S pre-rRNAs, and the high levels of 36S and 36S-C pre-rRNAs. We also noticed a drop of the levels of 12S pre-rRNA relative to its precursor, the 32S pre-rRNA (Figures 3A). A similar phenotype was observed in a control lymphoblastoid cell line treated with these siRNAs (Figure S1). When analyzed through the use of northern blot, total RNAs

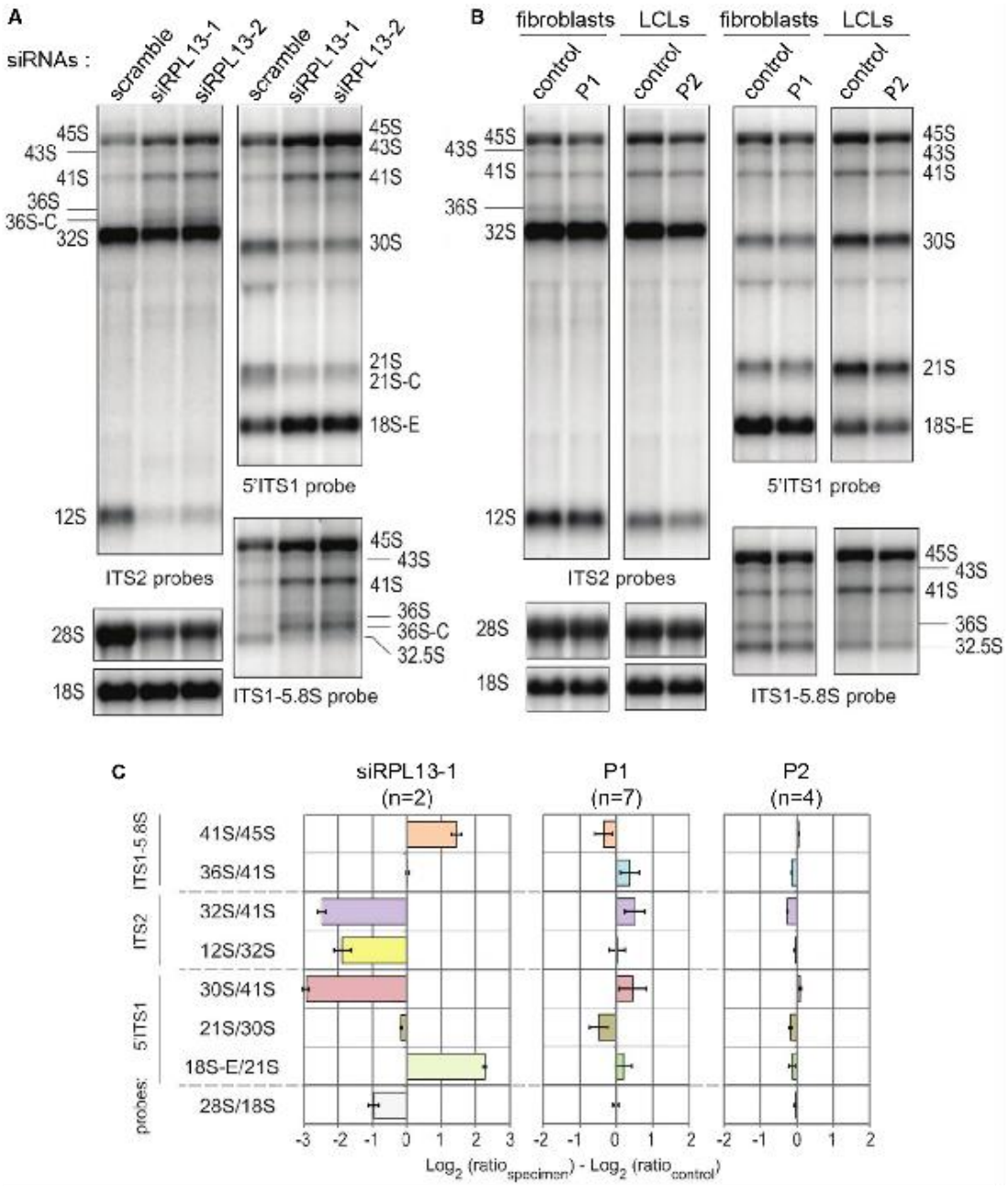


Figure 3. Consequence of Mutant RPL13 on Pre-rRNA Processing
(A) Northern blot analysis of pre-RNAs in HeLa cells treated with RPL13 siRNAs. The 5'ITS1 and the ITS2 probes detect the precursors to the 40S and 60S subunit RNAs, respectively. The ITS1-5.8S probe evidences accumulation of 36S and 36S-C precursors, indicative of a defect in cleavage at site 2.
(B) Northern blot analysis of pre-rRNAs from f broblasts of individual P1, lymphoblastoid cells of individual P2, and healthy donors with the same probes as in (A).
(C) Quantif cation of changes in the pre-rRNA pattern in (A) and (B) by ratio analysis of multiple precursors (RAMP)(27), expressed as variations relative to the respective controls (number of replicate are stated in the f gure). The analysis shows no signif cant variation in individual cells, unlike in RPL13 siRNA-treated cells.

from cells established from individuals P1 and P2 did not show such an abnormal pre-rRNA pattern, indicating that the RPL13 variants do not affect pre-rRNA maturation like a null mutant does (Figures 3B and 3C). Consistent with the lack of impact on pre-rRNA processing, a ribosome prof le on a sucrose gradient in lymphoblastoid cells from individual P2 showed a normal ratio of free 40S to 60S subunits compared to the control (Figures

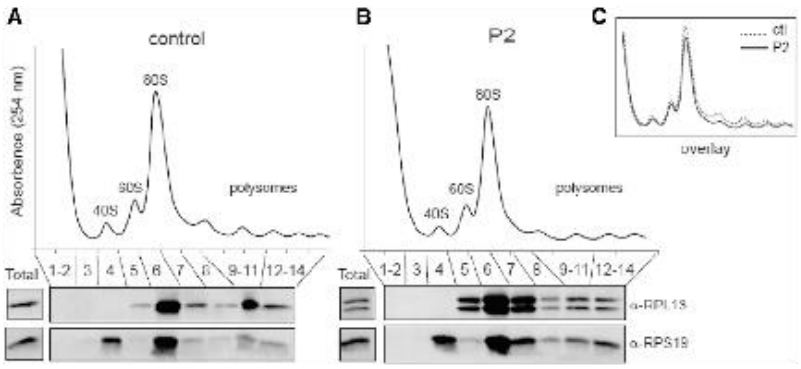


Figure 4. Incorporation of Variant RPL13 in Large Ribosomal Subunits
(A and B) Polysome profiles of lymphoblastoid cells from a healthy control (A) and from individual P2 (B) displaying free small ribosomal subunits (40S peak) and free large ribosomal subunits (60S peak). Monosomes (80S peak) and polysomes correspond to mRNAs bearing single ribosomes or several ribosomes, respectively. Western blot analyses probed with anti-RPL13 and anti-RPS19 antibodies are displayed below the corresponding gradient fractions.
(C) Overlay of the two polysome profiles shown in (A) and (B) for lymphoblastoid cells from a healthy control (ctl; dotted gray line) and from individual P2 (P2; solid black line).

4A and 4B). Importantly, we found that the RPL13 variant protein distributed in the gradient exactly as the wild-type protein. The variant is therefore incorporated into 60S subunits that form ribosomes competent for translation. We noticed, however, a decrease of the 80S and polysome peaks in the individual sample, which may indicate a change in translation dynamics (Figure 4C).

CD34þ cells isolated from peripheral blood were cultured in liquid culture over 15 days to evaluate erythroid proliferation. Only the late phase of the terminal erythroid differentiation was affected in the individual with the variant of RPL13 (Figure S2A). Cell viability during the complete erythroid differentiation time course has been confirmed (Figure S2B).

To assess the localization pattern of RPL13 in bone growth plate, cross sections of growth plate from 8-week-old healthy male mice were analyzed through the use of immunohistochemistry. Immunostaining revealed that RPL13 is present in cells from the hypertrophic zone and the remodelling zone. A weaker immunostaining was observed in cells located in the bone marrow compartment (Figure 5). Subsequently, we also evaluated three different RPs from the large and the small subunits of the ribosomes. RPL3 (MIM: 604163), RPS3 (MIM: 600454), and RPS10 (MIM: 603632) were immunohistochemically detected in cells from the growth plate, and they displayed the same localization pattern as did RPL13. RPL3, RPS3, and RPS10 were also found in the bone marrow compartment (Figure 5).

In this study, we report four unrelated individuals with a severe bone dysplasia sharing common clinical and radiological features. The abnormalities shared by the four individuals confirm a rare form of SEMD previously described for two of them.[6] All individuals presented with short stature, genu varum, epimetaphyseal anomalies, and platyspondyly but did not show any other symptoms, nor did they show any hematological abnormality on blood counts. The decreased erythroid cell proliferation reported at the terminal orthochromatophilic erythroblast stage should not be sufficient to generate an erythroid blockade and a aregenerative anemia as seen in DBA.

All individuals harbored a de novo RPL13 splice-site or missense variant. Based on the modeling of the adverse structural effects of the splice-site variants from two individuals, the mutant proteins are expected to be incorporated in pre-60S particles. Indeed, pre-rRNA processing does not seem to be affected in analyzed cells. We also showed that for variants c.477þ1G>T and c.477þ2T>C, the variant protein is incorporated into the ribosomes to the same extent as is wild-type RPL13 in analyzed cells.

These data provide evidence that these de novo variants in RPL13 cause a rare form of bone dysplasia with severe short stature, responsible for a human ribosomopathy which specifically affects bone tissue. Affected individuals

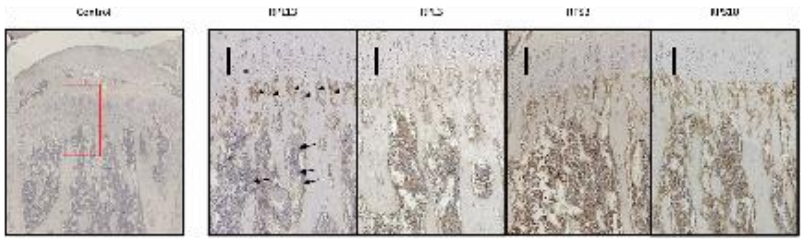


Figure 5. Immunochemistry of Four Riboproteins in Mouse Growth Plate
Micrographs of longitudinal sections of tibiae from 8-week-old mice immunohistochemically stained for the expression of RPL13, RPL3, RPS3, and RPS10. RPL13 is expressed in cells from the hypertrophic zone (black stars) and the remodeling zone (arrowheads) with a weaker staining in cells from the bone marrow compartment (solid arrows). Expression of RPL3, RPS3, and RPS10 was detected with the same pattern in the three compartments. Scale bars correspond to 100mm.

do not show any other symptoms such as anemia, bone marrow failure, or cranio-facial abnormalities, as can be observed in other ribosomopathies such as DBA, Shwachman-Diamond syndrome (SDS [MIM: 617941]) and cartilage hair hypoplasia (CHH-AD [MIM: 250250–607095]).[1]

RPL13, also known as eL13,[12] is a 211-amino-acid-long protein. RPL13 is known to be essential to ribosomal assembly because its depletion leads to maturation arrest at an early ribosomal assembly stage in yeast.[13] Consistently, we show that knockdown of RPL13 by siRNA in HeLa cells leads to an early defect in pre-rRNA processing, a defect which is characterized by an increase of the 45S and 41S precursors. However, our data suggest that ribosome biogenesis is not signif cantly affected by the variants reported here: we did not observe similar abnormality in pre-rRNA processing in the cells of individuals P1 and P2 (Figure 4B). We cannot exclude the possibility that a mild defect in ribosome biogenesis occurs in highly proliferative tissues like the growth plate, but could not be unambiguously detected here. The 60S subunits containing the RPL13 variants were detected in the same proportion as were the normal 60S subunits, including in the polysome fractions, which further indicates that incorporation of a variant RPL13 into a nascent 60S particle does not compromise its maturation, nor does it affect its stability in the cytoplasm. This is a fundamental difference compared to DBA, in which haploinsuff ciency of RPs impairs synthesis of ribosomes and thereby decreases their production rate. The ribosomal prof le on sucrose gradient in cells expressing the RPL13 variants is mildly changed, which suggests that translation is affected in individuals' cells. We assume that RPL13 could play a specif c role in the translation of particular mRNAs in chondrocytes or/and osteoblasts of the growth plate. In support of this hypothesis, loss of function of RPs has already been linked to very specif c developmental defects in mouse models in the absence of global translation defects.[14,15]

In DBA, mutations affecting RPs primarily affect erythropoiesis, but they also affect multiple other organs with variable penetrance. Skeletal abnormalities (e.g., abnormal thumbs, radial hypoplasia, short stature) have been reported in ribosomopathies such as DBA, but these conditions are not classif ed as skeletal dysplasias. In contrast, CHH-AD is a metaphyseal chondrodysplasia caused by RMRP (MIM: 157660) pathogenic variants and is considered to be a ribosomopathy.[16] RMRP is the RNA component of RNase MRP, a nucleolar ribonucleoprotein particle which catalyzes the endonucleolytic cleavage of the pre-rRNA at site 2.[17,18] RMRP is a key factor for the regulation of hypertrophic chondrocytes. It has been shown that the knockdown of RMRP leads to a defect of chondrocyte differentiation.[19] Our data show that RPL13, together with other RPs, is highly expressed in the growth plate and in cells lining the newly primary bone trabeculae, similar to RNase MRP. These high expression levels further stress the importance of ribosome biogenesis and translation in the growth plate. Whether the pathophysiological mechanisms underlying these two skeletal dysplasias share some common grounds remains to be explored.

Interestingly, a direct interaction between adenine 509 of the 28S rRNA and tyrosine 161 of RPL13 has been shown, with the adenine extruded from the double-stranded DNA.[20] Here, molecular modeling suggested that the 18-amino-acid insertion localized in this region might induce the removal of this interaction. A primary consequence of this insertion might be the blockade of a conserved 28S RNA binding on ES7L. Consistent with the production and stability of the 60S subunit containing the variants, the polypeptide insertion in RPL13 does not seem to inf uence the overall ribosome architecture. The p.Arg183Pro missense variant affects an amino acid which interacts with the 28S rRNA and is predicted to break the C-terminal alpha helix of RPL13, an alpha helix which extensively contacts the 28S rRNA. Hence, both splice and missense variants may destabilize the interaction of RPL13 C terminus with the 28S rRNA and compromise its function in translation.

In summary, our data demonstrate that RPL13 variants cause a rare skeletal dysplasia with short stature. The identif ed RPL13 variants do not modify overall ribosome biogenesis, even when the resulting variant RPL13 protein is integrated to the mature large subunit. This ribosomopathy might affect bone development by affecting the translation level of specif c mRNAs in cells from the growth plate, as shown in the erythroid lineage. Future studies will attempt to unravel the specif c impact of these RPL13 variants on translation of key factors of the growth plate.

Accession Numbers

The ClinVar accession numbers for the newly reported sequence variants are VCV000689800, VCV000689801, VCV000689802, and VCV000689803 (GenBank: NM_000977.3).

Supplemental Data

Supplemental Data can be found online at https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.09.024.

Acknowledgments

We would like to thank all families for participating in this study. P.E.G. and M.F.O'D. were funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) grants ANR-15-CE12-0001 and ANR-16-CE11-0029 and by the European Research Area Network (ERA NET) E-RARE project and ANR grant ANR-15-RAR3-0007-04 (European Diamond-Blackfan Anemia Consortium [EuroDBA]).

Declaration of Interests

K.McW. is an employee of GeneDx. A.P. is an employee of Center for Genomics and Transcriptomics and Praxis für Humangenetik Tübingen. The other authors declare no competing interests.

The American Journal of Human Genetics, Volume 105

Supplemental Data

RPL13 Variants Cause Spondyloepimetaphyseal Dysplasia with Severe Short Stature

Cedric Le Caignec, Benjamin Ory, François Lamoureux, Marie-Francoise O'Donohue, Emilien Orgebin, Pierre Lindenbaum, Stéphane Téletchéa, Manon Saby, Anna Hurst, Katherine Nelson, Shawn R. Gilbert, Yael Wilnai, Leonid Zeitlin, Eitan Segev, Robel Tesfaye, Mathilde Nizon, Benjamin Cogne, Stéphane Bezieau, Loic Geoffroy, Antoine Hamel, Emmanuelle Mayrargue, Benoît de Courtivron, Aliette Decock-Giraudaud, Céline Charrier, Olivier Pichon, Christelle Retière, Richard Redon, Alexander Pepler, Kirsty McWalter, Lydie Da Costa, Annick Toutain, Pierre-Emmanuel Gleizes, Marc Baud'huin, and Bertrand Isidor

The American Journal of Human Genetics, Volume 105

Supplemental Data

RPL13 Variants Cause Spondyloepimetaphyseal Dysplasia with Severe Short Stature

Cedric Le Caignec, Benjamin Ory, François Lamoureux, Marie-Francoise O'Donohue, Emilien Orgebin, Pierre Lindenbaum, Stéphane Téletchéa, Manon Saby, Anna Hurst, Katherine Nelson, Shawn R. Gilbert, Yael Wilnai, Leonid Zeitlin, Eitan Segev, Robel Tesfaye, Mathilde Nizon, Benjamin Cogne, Stéphane Bezieau, Loic Geoffroy, Antoine Hamel, Emmanuelle Mayrargue, Benoît de Courtivron, Aliette Decock-Giraudaud, Céline Charrier, Olivier Pichon, Christelle Retière, Richard Redon, Alexander Pepler, Kirsty McWalter, Lydie Da Costa, Annick Toutain, Pierre-Emmanuel Gleizes, Marc Baud'huin, and Bertrand Isidor

Figure S1

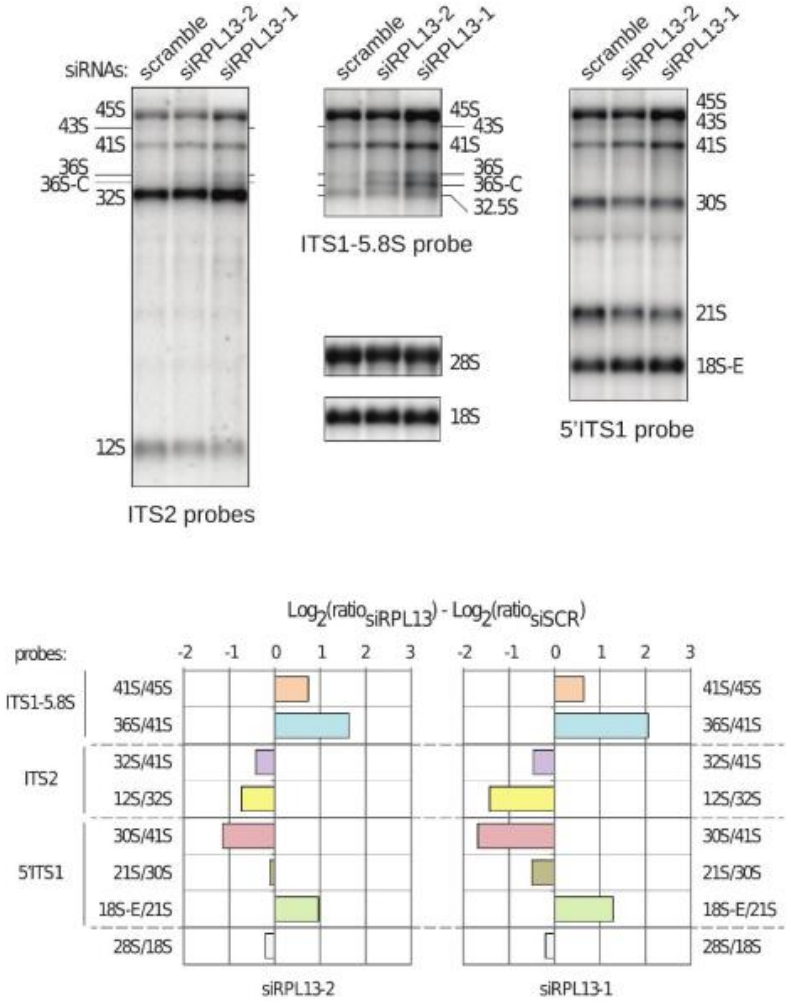
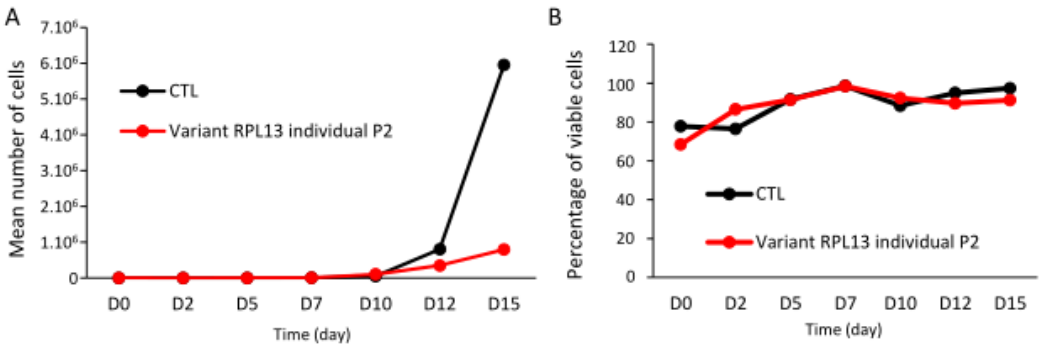

siRNAs: scramble siRPL13-2 siRPL13-1
45S
43S
41S
36S
36S-C
32S
12S
ITS2 probes
scramble siRPL13-2 siRPL13-1
45S
43S
41S
36S
36S-C
32.5S
ITS1-5.8S probe
28S
18S
scramble siRPL13-2 siRPL13-1
45S
43S
41S
30S
21S
18S-E
5'ITS1 probe
Log2(ratio siRPL13) - Log2(ratio siSCR)
probes:
ITS1-5.8S
ITS2
5'ITS1
41S/45S
36S/41S
32S/41S
12S/32S
30S/41S
21S/30S
18S-E/21S
28S/18S
-2 -1 0 1 2 3
siRPL13-2
siRPL13-1

Figure S2


A
Mean number of cells
7.10⁶
6.10⁶
5.10⁶
4.10⁶
3.10⁶
2.10⁶
1.10⁶
0
CTL
Variant RPL13 individual P2
D0
D2
D5
D7
D10
D12
D15
Time (day)
B
Percentage of viable cells
120
100
80
60
40
20
0
CTL
Variant RPL13 individual P2
D0
D2
D5
D7
D10
D12
D15
Time (day)

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure S1. Consequence of mutant RPL13 on pre-rRNA processing.

Northern blot analysis of pre-RNAs in lymphoblastoid cells treated with siRNAs targeting RPL13 mRNAs. The 5'ITS1 and the ITS2 probes detect the precursors to the 40S and 60S subunit RNAs, respectively. The ITS1-5.8S probe evidences an accumulation of 36S and 36S-C precursors when the level of RPL13 is reduced, which is indicative of a defect in cleavage at site 2. This cleavage occurs early and produces two separate pathways for the small and large ribosomal precursors.

Figure S2 : Erythroid proliferation is decreased in the variant RPL13 individual compared to the healthy control.

(A) Mean erythroid progenitor cell proliferation and (B) cell viability of peripheral $CD34^{+}$ cells from the variant RPL13 individual and from the control, from D0 to D15 during the complete erythroid differentiation (Mean of technical triplicates).

Table S1 : Primers for RPL13 RT-PCR

	Forward	Reverse
RPL13 (NM_000977.3)	ATGGCGCCCAGCCGGAATGG	AAACACACCACGTGGAGACC

MATERIALS AND METHODS

Individuals and Exome sequencing

Exome sequencing was performed in individuals P1, P2 and their parents following previously described procedures[1]. Through GeneMatcher[2], we subsequently identified two additional individuals (P3 and P4), yielding a total of four affected subjects from four families. All variants were confirmed by Sanger sequencing. We obtained written informed consent from all study participants in accordance with a protocol approved by respective institutional review boards (Nantes CHU ethical committee (MESR DC-2017-2987))

Fastqs of 60 samples (P1, P2, their parents and 54 samples unrelated to the present study) were mapped to grch37 using bwa-mem 0.7.12 and called with GATK 3.7.0 according to the Broad-Institute best-practices but the variants were not recalibrated because there were not enough data. The resulting VCF was annotated with SnpEff 4.3 and the gnomad database. De-novo genotypes called in either P1 and P2 but absent for the other individuals, missing in gnomad, were selected using vcffilterjs and grouped by gene using jvarkit/groupbygene. The candidate variants were visually checked with IGV.

The coding regions and flanking intronic regions of individual P3 and its parents were enriched using Agilent SureSelect XT All Exon V7 in-solution technology and were sequenced using the Illumina NovaSeq system. Illumina bcl2fastq2 was used to demultiplex sequencing reads. The reads were mapped to the human reference genome (hg19) using the Burrows Wheeler Aligner, and variants were called using Samtools and Varscan. Variants in the coding region and the flanking intronic regions (±8 bp) with a minor allele frequency (MAF) < 1.5% were evaluated. Known disease-causing variants (according to HGMD) within ±30 bp of flanking regions and up to 5% MAF were also evaluated. MAFs were taken from gnomAD and an in-house database. NGS based CNV calling was computed using an internally-developed method based on sequencing coverage depth; a model of the expected coverage that represents wet-lab biases as

well as inter-sample variation was used. CNV calling was performed by computing the sample's normalized coverage profile and its deviation from the expected coverage. Variants found in patient P3 and in its parents were compared and filtered for four cases: *de novo* in the patient, patient is compound heterozygous, patient is homozygous and the parents are heterozygous, patient is hemizygous and the mother is heterozygous for variants on the X-chromosome. Variants were evaluated based on the ACMG guidelines for the interpretation of sequence variants. Several additional in-silico panels were used to exclude the possible presence of non-trio variants which could explain the phenotype of the patient.

Using genomic DNA from individual P4 and parents, the exonic regions and flanking splice junctions of the genome were captured using the IDT xGen Exome Research Panel v1.0. Massively parallel (NextGen) sequencing was done on an Illumina system with 100bp or greater paired-end reads. Reads were aligned to human genome build GRCh37/UCSC hg19, and analyzed for sequence variants using a custom-developed analysis tool. Additional sequencing technology and variant interpretation protocol has been previously described [3]. The general assertion criteria for variant classification are publicly available on the GeneDx ClinVar submission page http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/submitters/26957/

Reverse transcription–PCR.

Total RNA was extracted from peripheral blood cells (P1 and P2), using TriReagent (Life Technologies). Total RNA was reversed transcribed using the ThermoScript RT–PCR System (Life Technologies). Two microliters of the RT reaction were subjected to Polymerase Chain Reaction (Life Technologies) using 0.2 µM of forward and reverse primers (Table S1). PCR were carried for 30 cycles. Each cycle consisted of 1 minute of denaturation at 94°C, 1 minute of annealing at 62°C and 1 minute of extension at 72°C. PCR products were were separated in a 1,7% agarose/1x TAE gel at 120 V for 1 hour and stained with SybrSafe (Life Technologies).

Pictures of the gel were taken by CCD camera under UV light (Syngene) and are representative of 3 independent experiments.

Western blotting analysis

Lymphoblastoid cells were established by EBV transformation of peripheral B cells using EBV supernatant harvested from the cell line B95-8 (American Type Culture Collection). Mesenchymal stem cells (P1 and healthy donor) and lymphoblastoid cells (P2 and healthy donor) were cultured respectively α-MEM and RPMI (GIBCO). Healthy donor cells were not matched for age and sex with individuals P1 and P2 cells. After cells lysis, samples containing equal amounts of protein (50 µg) were separated on 16% SDS-polyacrylamide gels, and proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes. The membranes were blocked in blocking buffer (LiCor, USA) at room temperature for 1 hour and blots were probed overnight at 4 °C with primary antibodies (RPL13, 1:800; Sigma-Aldrich) or vinculin (1:10.000; Cell signaling) to detect proteins of interests. After incubation, the membranes were washed three times with washing buffer (PBS containing 0.1% Tween) for 5 minutes. Membranes were then incubated for 1 hour with 1:10,000 diluted secondary antibodies (Li-Cor) at room temperature. Specific proteins were detected using Odyssey Fc (Li-Cor) after washing. Pictures are representative of 3 independent experiments.

Structural modelling

The protein structure of the mutated RPL13 protein was predicted using I-TASSER 5.1 [4-6]. I-TASSER selected the structure of the human ribosome as the best template (4V6X, [7]) to build high quality models. Visual inspection of models and interaction analysis were done with PyMOL 1.8 [8].

Tissue culture and siRNA treatment

HeLa cells were cultured in DMEM (GIBCO) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1 mM sodium pyruvate (Sigma). Two 21-mer siRNA duplexes (Eurogentec) were used to knock down expression of the human RPL13 mRNAs in HeLa cells (siRPL13-1: 5'-GGAAGAGAAGAAUUUCAAAdTdT-3'; siRPL13-2: 5'-CGUCUAUAAGAAGGAGAAAdTdT-3'). Knockdown efficiency was verified by qPCR. Each siRNA solution was added at a final concentration of 500 nM to 200 ml of cell suspension (50.10^6 cells/ml diluted in Na phosphate buffer, pH 7.25, containing 250 mM sucrose and 1 mM MgCl2). Electro-transformation was performed at 240 V with a Gene Pulser (Bio-Rad)[9]. Control HeLa cells were electro-transformed with a scramble siRNA (siRNA-negative control duplex; Eurogentec). After 10 minutes of incubation at ambient temperature, cells were plated and grown at 37°C for 48 hours.

RNA extraction and analysis by northern blot

Total RNAs were extracted with TriReagent from cell pellets containing 20-30.10^6 cells. The aqueous phase was further extracted with phenol-chloroform-isoamylic alcohol (25:24:1; Sigma), then with chloroform. Total RNAs were recovered after precipitation with 2-propanol. For Northern blot analyses, RNAs were dissolved in formamide, denatured for 10 minutes at 70°C, and separated on a 1.2% agarose gel containing 1.2% formaldehyde and 1X Tri/Tri buffer (30 mM triethanolamine, 30 mM tricine, pH 7.9) (3 µg RNAs/lane). RNAs were transferred to a Hybond N^+ nylon membrane (GE Healthcare) by passive transfer and cross-linked under UV light. Pre-hybridization was performed for 1 hour at 45°C in 6X SSC, 5X Denhardt's solution, 0.5% SDS, 0.9 g/ml tRNA. The 5'-radiolabeled oligonucleotide probe was incubated overnight. The sequences of the probes were: 5'-ITS1 (50-CCTCGCCCTCCGGGCTCCGTTAATGATC-

3'), ITS1-5.8S (5'-CTAAGAGTCGTACGAGGTCG-3'), ITS2 (ITS2b: 5'-CTGCGAGGGAACCCCCAGCCGCGCA-3' and ITS2d/e: 5'-GCGCGACGGCGGACGACACCGCGGCGTC-3'), 18S (5'-TTTACTTCCTCTAGATAGTCAAGTTCGACC-3'), 28S (5'-CCCGTTCCCTTGGCTGTGGTTTCGCTAGATA-3'). Membranes were washed twice for 10 minutes in 2X SSC, 0.1% SDS and once in 1X SSC, 0.1% SDS, and then exposed. Signals were acquired with a Typhoon Trio PhosphorImager (GE Healthcare) and quantified using the MultiGauge software. Pictures are representative of 3 independent experiments.

Polysome profiling

Lymphoblastoid cells (healthy donors and individual 2) were treated with 100 µg/ml cycloheximide (Sigma-Aldrich) for 10 min. The cytoplasmic fractions were prepared on ice as described above, except that cycloheximide was added to all buffers [10]. A sample volume containing 1 mg of total proteins was loaded on a 10–50% (wt/wt) sucrose gradient and the tubes were centrifuged at 36 000 rpm and at 4°C for 2 hours in a SW41 rotor (Optima L100XP ultracentrifuge; Beckman Coulter). The gradient fractions were collected at OD254 nm with a Foxy Jr. gradient collector (Teledyne Isco). Each fraction was centrifuged on a Vivaspin 500 concentrator (Sartotrius Stedim Biotech) in order to remove sucrose. Half of it was then used for RNA extraction with TriReagent, while the other half was used to extract total proteins with TCA.

Culture of human primary cells

CD34+ cells from peripheral blood of individual P2 and a healthy control were isolated by immunomagnetic technique using manual column (Miltenyi Biotec, Paris, France). Purified CD34+ cells were cultured in IMDM medium using 3% AB serum (Sigma Aldrich), 2% human peripheral blood plasma (stem cell technologies), 10 µg/ml Insulin (Sigma Aldrich), 3U/ml

Heparin (Sigma Aldrich), 200 µg/ml Holo-Transferrin (Sigma Aldrich), 10 ng/ml stem cell factor (SCF) (Miltenyl biotech), 1 ng/ml IL3 (Stem Cell Technologies), 3 IU/ml EPO and 1% Penicillin/Streptomycin (final concentrations). This media was used from day 0 to day 6, then deprivated from IL3 and EPO concentration was used at 1 IU/ml from day 7 to day 10. From day 11 to day 15, SCF was removed and EPO and Holo-Transferrin was used respectively at 0.1 IU/ml and 1 mg/ml, and 100% Penicillin/Streptomycin (final concentrations). Viable cells were counted in triplicate using the trypan blue dye exclusion test as a function of time in culture. Bars represent mean of technical triplicate.

Immunochemistry

All procedures involving mice (their housing and care in the Experimental Therapeutic Unit at the Faculty of Medicine of Nantes, France, the method by which they were anesthetized and killed, and all experimental protocols) were conducted in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee (CEEA.PdL.2011.32). Eight-week old C57BL/6 male mice were sacrificed, tibiae were collected and were decalcified with 4.13% EDTA and 0.2% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) for 96 hours using the KOS microwave histostation (Milestone, Kalamazoo, MI) before embedding in paraffin. Sections (3 µm thick, Leica Microsystems) were analyzed by immunostaining for RPL13, RPL3, RPS3 and RPS10. Protocols were performed as described previously [11] with rabbit anti-RPL13, anti-RPL3, anti-RPS3 and anti-RPS10 antibodies (1/800; Sigma for RPL13 and 1/1000 GeneTex for RPL3, RPS3 and RPS10).

REFERENCES OF SUPPLEMENTAL DATA

1. Isidor, B., Lindenbaum, P., Pichon, O., Bezieau, S., Dina, C., Jacquemont, S., Martin-Coignard, D., Thauvin-Robinet, C., Le Merrer, M., Mandel, J.L., et al. (2011). Truncating mutations in the last exon of NOTCH2 cause a rare skeletal disorder with osteoporosis. Nature genetics 43, 306-308.
2. Sobreira, N., Schiettecatte, F., Valle, D., and Hamosh, A. (2015). GeneMatcher: a matching tool for connecting investigators with an interest in the same gene. Hum Mutat 36, 928-930.
3. Retterer, K., Juusola, J., Cho, M.T., Vitazka, P., Millan, F., Gibellini, F., Vertino-Bell, A., Smaoui, N., Neidich, J., Monaghan, K.G., et al. (2016). Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. Genet Med 18, 696-704.
4. Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. Nature protocols 5, 725-738.
5. Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., and Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. Nature methods 12, 7-8.
6. Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC bioinformatics 9, 40.
7. Anger, A.M., Armache, J.P., Berninghausen, O., Habeck, M., Subklewe, M., Wilson, D.N., and Beckmann, R. (2013). Structures of the human and Drosophila 80S ribosome. Nature 497, 80-85.
8. Schrödinger, L. (2015). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.
9. Paganin-Gioanni, A., Bellard, E., Escoffre, J.M., Rols, M.P., Teissie, J., and Golzio, M. (2011). Direct visualization at the single-cell level of siRNA electrotransfer into cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 10443-10447.
10. Baudin-Baillieu, A., Hatin, I., Legendre, R., and Namy, O. (2016). Translation Analysis at the Genome Scale by Ribosome Profiling. Methods Mol Biol 1361, 105-124.
11. Baud'huin, M., Lamoureux, F., Jacques, C., Rodriguez Calleja, L., Quillard, T., Charrier, C., Amiaud, J., Berreur, M., Brounais-LeRoyer, B., Owen, R., et al. (2017). Inhibition of BET proteins and epigenetic signaling as a potential treatment for osteoporosis. Bone 94, 10-21.

II. Identification de gènes candidats via des analyses de l'exome chez des familles atteintes d'ABD (Hôpital R. Debré, Paris)

Deux familles atteintes d'ADB ont particulièrement été étudiées. Elles font parties de l'observatoire français des patients atteints d'ABD (OFABD) (Dr T. Leblanc/Pr L. Da Costa/I. Marie). Aucune variation allélique ou délétion délétère n'a été individualisée en targeted-NGS et en CGH/SNP array respectivement (J. Galimand/L. Da Costa, service d'Hématologie Biologique, Hôpital R. Debré, Paris). Ces deux propositi issus de deux familles non apparentées étaient des bons candidats pour le séquençage d'exomes. Après vérification d'une quantité nécessaire en ADN (10 µg)/patient (quantification), de la présence en banque des ADN de chacun des deux parents biologiques (trios) et de la vérification de la qualité des ADN sur gel d'agarose, les ADN des deux trios ont fait l'objet d'un séquençage d'exome (plateforme Imagine, Institut Imagine, Paris).

Les analyses d'exomes ont été réalisées via le site polyweb par J. Galimand, Mélanie Nehlich ou moi-même (Hématologie Biologique, Hôpital R. Debré, Paris). Nous avons établi les critères de sélection des gènes candidats pour chacune des familles de la manière suivante : une fréquence allélique inférieure à 1%, une absence d'EVS, un déjà vu inférieur à 10 et un critère de confiance élevée. Puis nous avons choisi un modèle testé en première intention de néomutation ou mutation dominante, puis strict *de novo* et lorsque aucun gène n'étant probant, nous adoptions un mode de transmission récessif.

À la suite des résultats obtenus, j'ai porté mon intérêt sur 8 gènes candidats de l'ABD du fait de leur appartenance à l'une des familles suivantes : des protéines ribosomiques, des chaperons du ribosome ou de protéines ribosomiques, des protéines chaperons HSP70 ou des protéines régulant la prolifération et la différenciation cellulaire. L'équipe et moi-même avons pris contact avec le personnel soignant pour chacune des familles présentant une mutation de l'un de ces gènes afin d'instaurer un suivi des hospitalisations et des prélèvements. Nous avons ainsi mis en place dans toute la France, un réseau entre les patients, le milieu hospitalier et notre équipe au laboratoire. Cette démarche m'a permis d'effectuer des demandes de prélèvements sanguins des patients et d'importer ces échantillons au laboratoire. Pour chaque patient, et sa famille dans la mesure du possible, les prélèvements ont été effectué en hôpital de jour ou aux urgences à distance d'une transfusion sanguine. A la suite de la réception des échantillons de patients ainsi que ceux des contrôles dont la demande a été réalisé simultanément à l'annonce d'un prélèvement, je réalisais pour chaque patient et contrôle sain des cultures primaires des

cellules CD34$^+$ issues de sang périphérique ou de moëlle osseuse. Les cellules CD34$^+$ étaient extraites à J0 à partir de PBMCs obtenus à la suite d'un gradient de ficoll effectué sur sang total issus des échantillons de patients, de membres de leur famille et de témoins reçus. Les cellules CD34$^+$ sont mises en culture à raison de 100 000 cellules /ml selon le protocole précédemment énoncé. Parallèlement à l'extraction des cellules CD34$^+$, j'apportais un échantillon au laboratoire « Alloimmunité – Autoimmunité – Transplantation » de l'Institut Universitaire d'Hématologie (IUH) ou au Centre de Ressources Biologiques (CRB) de cochin afin d'établir une lignée lymphoblastoïde infectée par le virus EBV à partir de cellules lymphocytaires B. L'établissement de cette lignée nous permet de pallier la faible prolifération des cellules CD34$^+$ différentiées *ex vivo* issues des échantillons de patients. Une fois l'immortalisation réalisée et stable, je récupérais les cellules (une ampoule de congélation par patient) que je mettais en culture afin de les amplifier (stockage ou culture) et de réaliser les techniques nécessaires à mon projet.

Pour chacun des patients j'ai réalisé, si possible, à différents jours de différenciation érythroïde *ex vivo*, une étude par cytométrie en flux des marqueurs de différenciation de l'érythropoïèse, une analyse du cycle cellulaire et de l'apoptose. Je réalisais également des colorations MGG afin d'observer la morphologie cellulaire et de quantifier les différents stades de différentiation des érythroblastes. En parallèle, j'ai quantifié l'ARNm par qPCR et la protéine correspondante par Western blot pour chaque gène d'intérêt ainsi que pour différents intermédiaires clés des voies de signalisation potentiellement impliquées dans le phénotype érythroïde. La très faible quantité de cellules CD34$^+$ issues des échantillons de patients et la faible prolifération au cours de la différentiation érythroïde m'a obligé à réaliser une technique à un jour d'analyse par prélèvement. J'ai donc eu recours à de nombreux prélèvement sanguins auprès des patients pour obtenir nos résultats qui n'ont pu être réalisé qu'une fois par technique.

Au cours de mes différentes études, je préparais également des culots cellulaires de cellules lymphoblastoïdes immortalisés par EBV et de CD34$^+$ issues d'échantillons de patients, de témoins sains ou de sang de cordon. Puis je les envoyais à nos équipes collaboratrices afin de réaliser les études portant sur la biogenèse du ribosome (Nothern Blot, Bioanalyzer et polysomes).

J'ai réalisé initialement toutes les mises au point pour les différentes techniques sur les cellules lymphoblastoïdes ou sur des cellules CD34$^+$ extraites à partir de sang de cordon sain afin d'adapter nos protocoles au nouveau laboratoire d'accueil.

A. Une protéine chaperon appartenant à la famille des HSP70 : HSPA14

1. Phénotype et génotype d'un cas d'ABD particulier

Le résultat de l'analyse d'exome réalisé sur 25 familles de patient ABD au début de ma thèse a permis d'identifier une variation dans le gène *HSPA14* à l'état homozygote. Il s'agit d'un variant faux-sens hétérozygote du gène *HSP14* : NM_016299.3 ; exon 9 ; c.809A>G ; p.H270R. Cette variation est une variation allélique faux-sens de pathogénicité inconnue (VUS) mais absente complètement des contrôles. L'évaluation *in silico* de l'impact fonctionnel du variant faux-sens identifié a été caractérisé par un score *Polyphen2* élevé (0.999), permettant d'émettre l'hypothèse d'un effet pathogène de la mutation. Elle a également été retrouvée chez la mère du patient. Du fait de son appartenance à la famille des protéines chaperons HSP70, dont le membre HSP70-1 a été précédemment montré comme impliqué dans le défaut de l'érythropoïèse au cours de l'ABD et d'un score prédictif de son impact fonctionnel élevé, nous avons porté notre intérêt sur ce gène.

La famille consistait en un patient atteint d'anémie de Blackfan-Diamond, de sexe masculin. Il est actuellement âgé de 34 ans et a présenté une anémie néonatale nécessitant 3 transfusions dans les premiers mois de vie. Il présente également des malformations qui associent une fente palatine, un pouce droit anormal, et une ectopie testiculaire bilatérale. La mesure de son activité de l'eADA montre que celle-ci est élevée. Ce patient fut bon répondeur aux corticoïdes qui l'ont conduit à une indépendance thérapeutique à l'âge de 15 ans et qui dura 10 ans. Depuis, il est cortico-résistant et a besoin d'être transfusé régulièrement avec un chélateur en fer (Exjade). La santé du patient nécessite une transfusion sanguine toutes les 2 à 3 semaines.

2. Etude de l'érythropoïèse dans les cellules primaires *ex vivo* du patient ABD porteur de la variation allélique du gène *HSPA14*

a. Nombre de cellules $CD34^+$

Pour étudier l'érythropoïèse chez le patient possédant une mutation d'une protéine chaperon, j'ai réalisé des cultures primaires des cellules $CD34^+$ issues de sang périphérique des patients ABD et de témoins sains collectés simultanément. Au cours de ma thèse, j'ai pu mener à bien 4 différenciations érythroïdes pour ce patient sur les 7 envois de prélèvements effectués.

Nous avons décidé de conserver les 4 expériences ayant permis de réaliser une culture des cellules $CD34^+$ jusqu'au premier jour d'intérêt (J7) de notre protocole.

Au cours de l'extraction des cellules $CD34^+$, je réalisais la numération des cellules PBMCs collectés ainsi que du nombre de cellules $CD34^+$ obtenues à partir de ces PBMCs. La moyenne de PBMCs rapporté au volume de sang obtenus chez le patient ABD (UPN#961) est de 7,76 x 10^6 (en nombre de PBMCs/ml) et de 8,49 x10^6 chez le donneur sain (en nombre de PBMCs/ml). Bien que le nombre de PBMCs du patient ABD soit quasi-similaire au donneur sain (figure 44 A), le nombre de cellules $CD34^+$ issues des PBMCs du patient ABD est diminué par rapport au celui du donneur sain (figure 44 B). La moyenne du nombre de $CD34^+$ obtenues chez le patient ABD est de 13 490 cellules/ml alors qu'elle est de 21 100 cellules/ml chez le donneur sain. Le pourcentage de $CD34^+$ extraites chez le patient DBA (0.13%) est divisé par deux comparativement au donneur sain (0.23%) (figure 44 C). J'ai choisi pour ces expériences des contrôles du même sexe et d'âge similaire afin d'éliminer la possibilité d'un biais apparenté à ces deux critères. Il semble donc que le variant *HSPA14* induise une diminution du nombre de cellules $CD34^+$ chez le patient alors que son nombre de PBMCs est normal. Il serait intéressant d'obtenir une numération cellulaire du patient afin de vérifier l'impact de cette mutation sur le nombre de cellules des autres lignées hématopoïétiques.

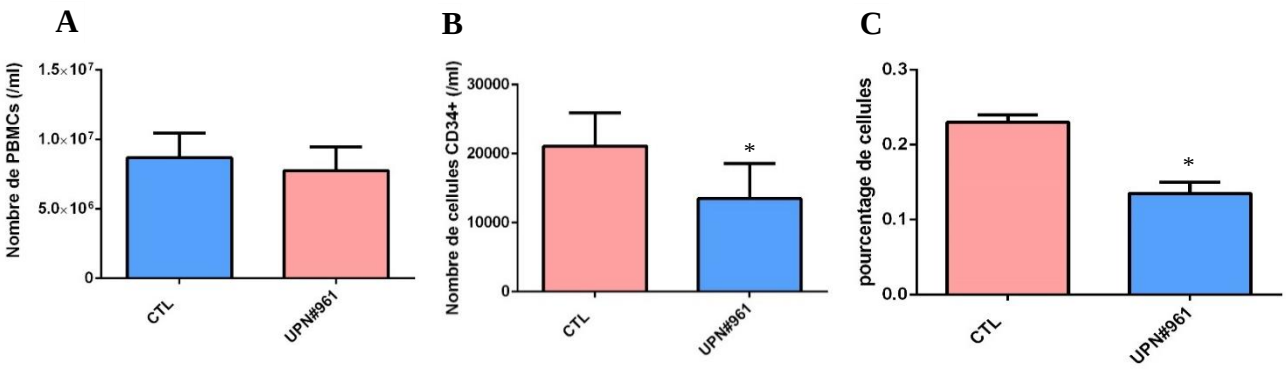


Figure 44: **Nombre de cellules $CD34^+$ extraites après isolement de PBMCs à partir de sang total de patient ABD (UPN#961) ou de témoins (CTL).** (A) Nombre de PBMCs (/ml) issues du sang total chez le patient ABD et le donneur sain. (B) Nombre de cellules $CD34^+$ extraites (/ml) après isolement des PBMCs chez le patient ABD et le donneur sain. (C) Pourcentage des cellules $CD34^+$ extraites après isolement des PBMCs chez le patient ABD et le donneur sain. Moyennes et écart-types de quatre expériences indépendantes. N=4*=P <0.05

b. Etude de la prolifération des cellules CD34$^+$ *ex vivo* mises en culture

Les cultures primaires de CD34$^+$ ont été réalisées sur 7 à 10 jours pour le patient ABD porteur d'une mutation en son gène *HSPA14* dans la finalité d'étudier la prolifération et la division cellulaire ainsi que la viabilité des cellules au cours de la différenciation érythroïde dans nos conditions de culture.

Le patient doit être transfusé toutes les deux-trois semaines afin compenser l'anémie et l'absence de cellules érythroïdes circulantes. C'est pourquoi je me suis intéressée à la mortalité/viabilité cellulaire *ex vivo* des cellules CD34$^+$ mises en culture. Je dénombrais les cellules vivantes et les cellules mortes au microscope optique par coloration au bleu de trypan à 0,2%. Ainsi, la moyenne du pourcentage des cellules vivantes chez le patient ABD est de 49,74% à J2 puis 60,18% à J5 et 66,03% à J7 contre respectivement 76,57%, 77,25% et 90,69% pour la moyenne des contrôles. La viabilité cellulaire est donc réduite chez le patient ABD par rapport au témoin (figure 45A). Le patient possédant une variation allélique du gène *HSPA14* a de nombreux débris cellulaires observables au microscope optique au cours de la différenciation érythroïde *ex vivo*. Ces débris ne sont pas comptabilisés dans le calcul de viabilité cellulaire. Il est donc raisonnable d'émettre l'hypothèse que la viabilité cellulaire est sous-estimée chez ce patient. De plus, le nombre de cellules en culture dénombré est réduit pour le patient ABD. En effet, alors que le témoin voit sa croissance cellulaire progresser de 13.2 (en ln) à J0 à 15.4 (en ln) à J7, la croissance cellulaire des cellules du patient ABD diminue de 13 (en ln) à J0 à 12.5 (en ln) à J7. Ainsi, la croissance cellulaire des cellules CD34$^+$ issues du patient ABD porteur de la variation allélique de *HSPA14* est diminuée et plus faible en comparaison des témoins (figure 45B). Le variant HSPA14 semble donc avoir un impact sur la survie et la prolifération des cellules érythroïdes mises en culture du patient.

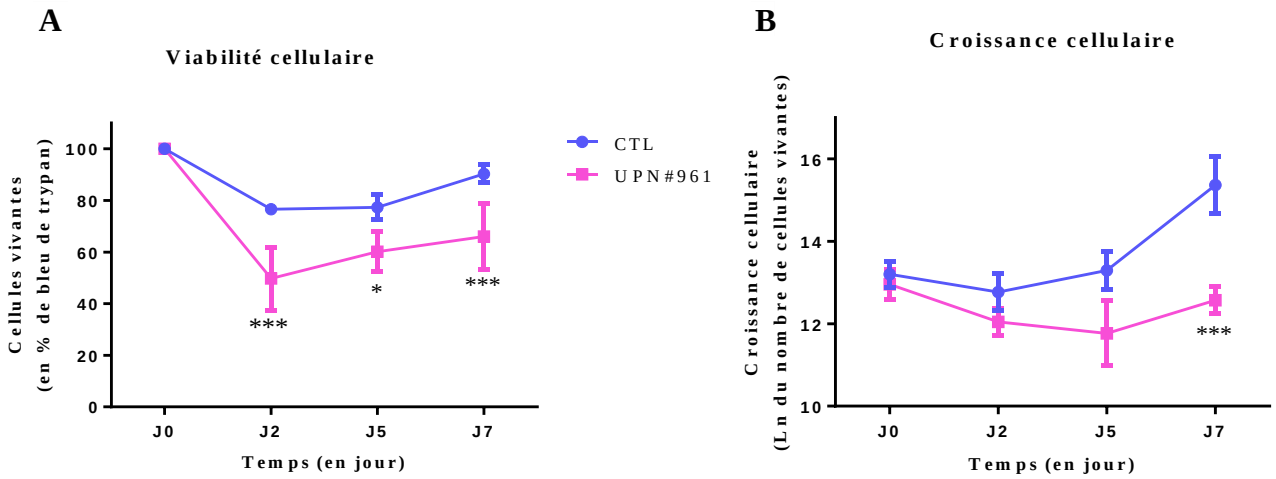


Figure 45: Défaut de prolifération cellulaire des cellules érythroïdes issues des CD34+ issues du sang périphérique du patients ABD (UPN#961) portant une variation allélique du gène *HSPA14* et d'un témoin (CTL). A) Pourcentage de cellules érythroïdes viables au cours de la différenciation érythroïde mis en évidence par coloration au bleu trypan 0,2%. (B) Courbe de croissance des cellules $CD34^+$ en différenciation érythroïde *ex vivo*. Moyennes et écart-types de quatre expériences indépendantes. *=P <0.05 ; ***=P <0.001

Je me suis intéressée dans le même temps au facteur d'amplification des cellules (ou nombre de division que celles-ci subissaient) entre les différents jours d'intérêt mis en place par notre protocole d'étude de l'érythropoïèse. La moyenne du facteur d'amplification des quatre expériences de différenciation érythroïde chez le patient porteur d'un variant *HSPA14* varie d'un facteur de 0,4 à J2 à un facteur de 4,36 à J7. En comparaison, la moyenne du facteur d'amplification varie de 0,66 à J2 à un facteur de 22 chez les témoins sains. Initialement divisé par un facteur de 1,6 au cours des 5 premiers jours de culture, le facteur d'amplification est par la suite divisé jusqu'à 5 fois entre les témoins et le patient (figure 46A). Le facteur d'amplification des cellules érythroïdes issues des $CD34^+$ mises en culture est donc diminué chez le patient ABD UPN#961.

J'ai calculé la moyenne nombre de division cellulaire entre chaque jour d'intérêt de notre protocole pour les quatre expériences de différenciation érythroïde réalisées sur les prélèvements du patient ABD. Ainsi, à J2 de culture, la moyenne du nombre de division est de -0,79 pour les témoins sains contre -1,31 pour le patient ABD. A J5 et J7 de culture, le nombre de division cellulaire est respectivement 0,76 et -0,40 et 1,16 pour les témoins sains contre -0,4 et 1,16 pour le patient ABD porteur d'un variant *HSPA14*. La moyenne du nombre de division

cellulaire est diminuée chez le patient ABD en comparaison de celle des témoins sains. Le nombre de division cellulaire du patient ABD est divisé jusqu'à 2,8 fois par rapport aux contrôles (figure 46B).

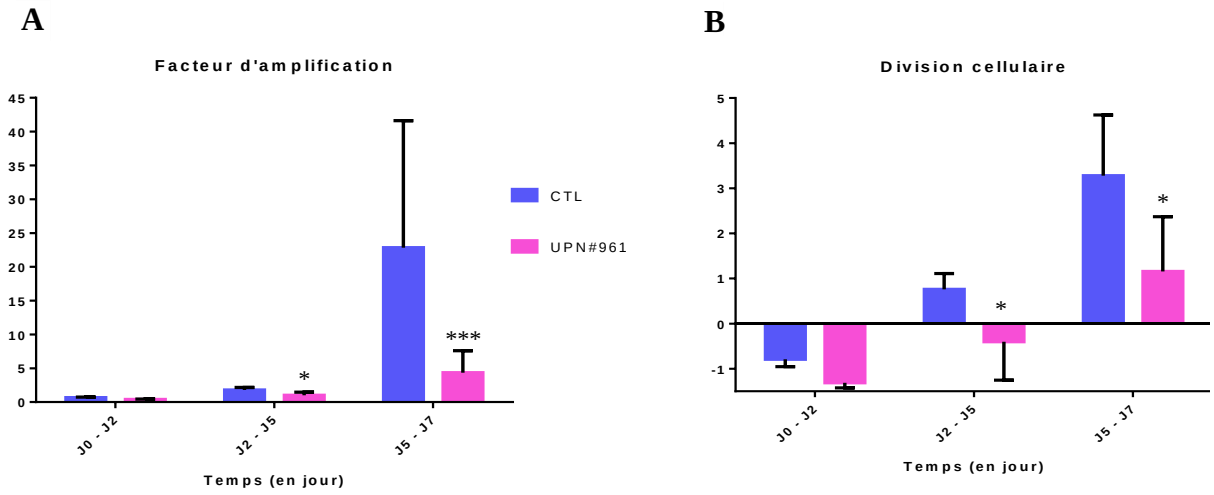


Figure 46 : Défaut d'amplification et de division cellulaire des cellules CD34+ issues de sang périphérique du patients ABD (UPN#961) et de témoins (CTL) en cours de différenciation érythroïde. (A) Facteur d'amplification des cellules érythroïdes. (B) Nombre de division cellulaire des cellules érythroïdes. Moyennes et écart-types de quatre expériences indépendantes pour le patient UPN#961. *=P <0.05 ; ***=P <0.001

Le patient porteur d'une variation allélique du gène *HSPA14* présente un défaut de prolifération des cellules érythroïdes mises en culture à partir d'échantillon de sang périphérique. En effet, une anomalie importante de la croissance cellulaire a été mise en évidence chez le patient. Ce défaut cellulaire montré au cours des différentes expériences est associé à une viabilité cellulaire diminuée accompagnée de nombreux débris cellulaires observés au cours de la culture *ex vivo*. Le facteur d'amplification est également réduit pouvant être divisé jusqu'à 5 entre le patient ABD et le témoin. Il en est de même pour le nombre de divisions cellulaires étant divisé par 3 chez le patient.

c. Etude des marqueurs de surface au cours de la différenciation érythroïde *ex vivo*

Afin d'étudier la présence des divers marqueurs de différenciation au cours de l'érythropoïèse, j'ai réalisé des analyses de cytométrie en flux sur des cellules érythroïdes issues de $CD34^+$ en culture. La faible prolifération et viabilité des cellules mises en culture ne permettent pas de réaliser l'analyse de tous nos marqueurs de différenciation au cours de la même expérience. Il m'a fallu un échantillon de sang périphérique et une mise en culture des cellules $CD34^+$ pour chaque technique. Du fait de la faible quantité de cellules obtenues, j'ai réalisé une seule expérience par analyse. Il m'est donc impossible de d'analyser statistiquement mes résultats.

L'analyse des marqueurs de différenciation au cours de l'érythropoïèse par cytométrie en flux a été initialisée sur des cellules érythroïdes issues de $CD34^+$ en culture à différents jours de l'érythropoïèse (J7 et J10). La présence d'un nombre très faible de cellules n'a pas toujours permis d'analyser de façon optimale les résultats de cytométrie en flux. A ce stade de la différenciation érythroïde (J7), les cellules du témoin sain (contrôle) sont négatives pour le marqueur CD34 alors qu'elles sont positives à plus de 90% pour le marqueur CD36 (figure 47A). Les résultats obtenus correspondent à ceux attendus en condition normale. En effet, en condition physiologique, le marqueur d'immaturité CD34 doit disparaître au début de la différenciation érythroïde alors que le marqueur de différenciation CD36 doit être fortement exprimé entre J7 et J12. A l'inverse, en condition pathologique, les cellules du patient ABD sont positives à 5,54% pour le marqueur d'immaturité CD34 et positive à seulement 65,57% pour le marqueur CD36. J'ai également porté mon intérêt sur un second marqueur d'immaturité, IL-3R. En condition normale, le marqueur d'immaturité IL-3R disparaît au cours de l'érythropoïèse. Ainsi, notre analyse en cytométrie en flux est conforme à ce que nous attendions avec un pourcentage d'IL-3R faible pour le témoin sain (moins de 18%). Lorsque nous comparons en condition pathologique pour le patient ABD, nous observons un fort pourcentage de cellules possédant un récepteur à l'IL-3 (76,11%) (figure 47B). Le patient ABD présente donc 4 fois plus de cellules possédant le marqueur d'immaturité.

En conclusion, mes résultats permettent de montrer un retard dans la disparition des marqueurs d'immaturité telles que les marqueurs CD34 et IL3-R chez le patient porteur d'un variant du gène *HSPA14*. En parallèle, un retard dans l'apparition du marqueur de différenciation CD36 est montré lors de notre analyse.

Un autre fait intéressant a été observé au cours de l'analyse de cytométrie en flux réalisée. En condition physiologique, les cellules CD34^{+} qui se différencient perdent progressivement leur antigène CD34 de leur surface cellulaire mais acquièrent simultanément l'antigène CD36. En effet, les dot-plots mettent en évidence que dans la condition contrôle, la majorité des cellules CD34 négatives sont CD36 positives (80%) comme attendu. En revanche, nous observons un pourcentage non négligeable de cellules étant à la fois CD34 et CD36 négatives chez le patient ABD (31%) (figure 47C). Cette population identifiée n'est pas encore positive pour le marqueur CD36 mais correspond à une population de cellules vivantes.

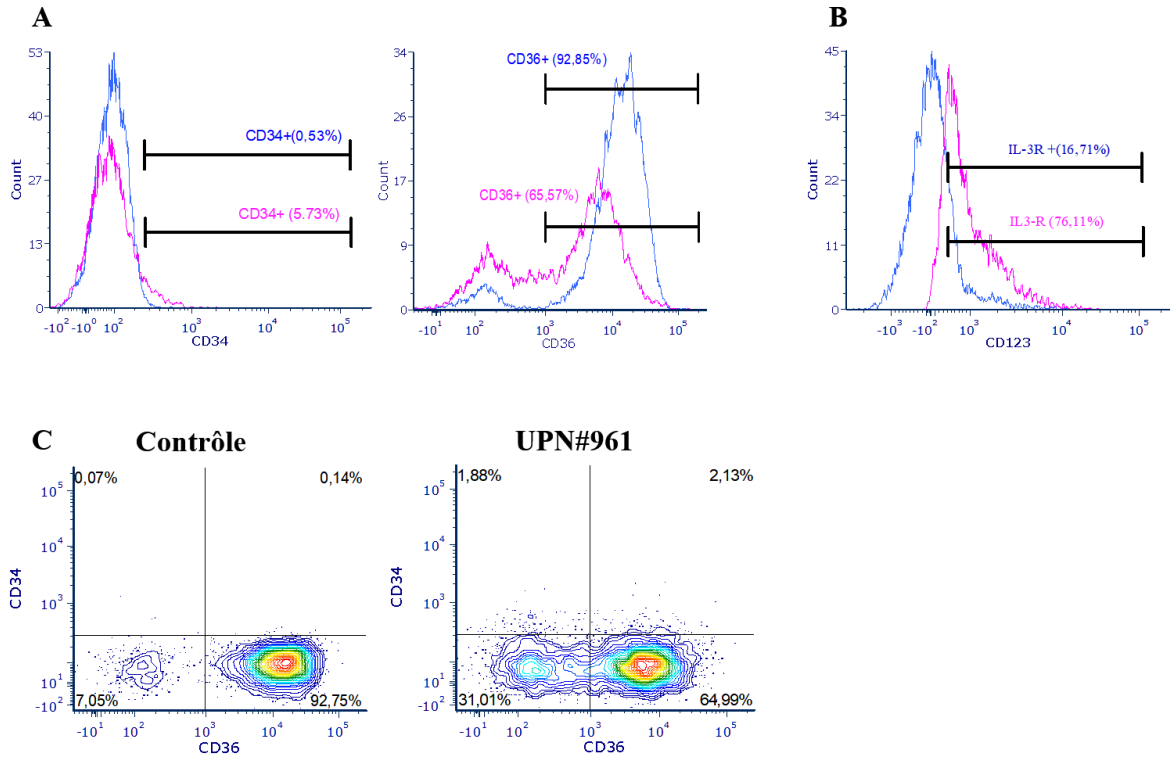


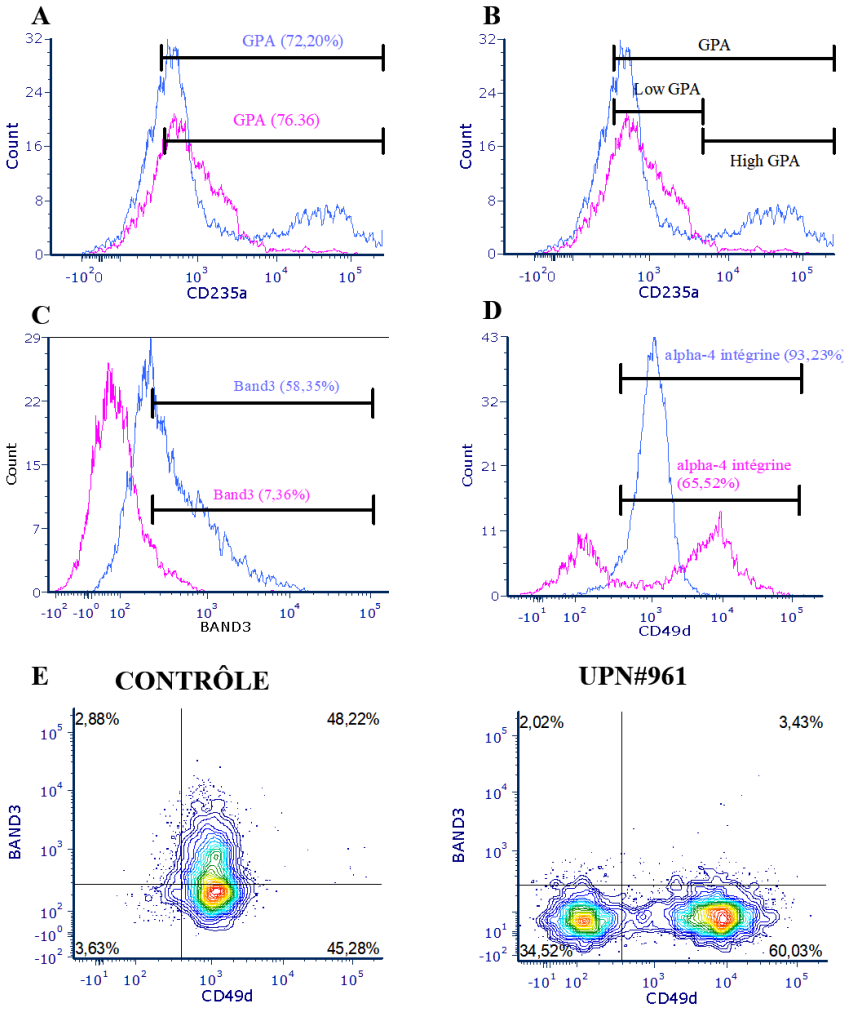
Figure 47: Persistance des marqueurs d'immaturité à la surface des cellules érythroïdes issues des CD34^{+} au cours de la différenciation érythroïde. (A) Histogramme des marqueurs CD34 et CD36 chez le patient ABD porteur du variant *HSPA14* et un contrôle. (B) Histogramme du marqueur IL-3R chez le patient ABD porteur du variant *HSPA14* et un contrôle. (C) Dot plot des marqueurs CD34 et CD36 pour le patient ABD porteur du variant *HSPA14* et un contrôle. En rose : Patient ABD (UPN#961), en bleu : contrôle sain.

Au cours d'une autre différenciation érythroïde des cellules CD34+ issues du patient ABD ainsi que d'un nouveau témoin sain, j'ai réalisé une analyse des marqueurs de différenciation terminale par cytométrie en flux. Le marqueur GPA, qui est le marqueur principal de la lignée des érythrocytes a permis de vérifier que les cellules analysées par cytométrie en flux appartenaient bien à la lignée érythroïde. En effet, l'identification d'une nouvelle population de cellules étant à la fois CD34 et CD36 négatives posait la question d'une éventuelle présence d'une lignée autre qu'érythroïde. Le témoin contrôle et le patient ABD expriment un pourcentage de GPA non significativement différent (respectivement 72,20% et 76,36%). Je me suis intéressée à la médiane d'intensité de fluorescence (MFI) de la population GPA pour le patient ABD et le témoin. J'ai subdivisionné en deux groupes la fluorescence du marqueur GPA avec un groupe exprimant faiblement le GPA (low GPA) et un groupe exprimant fortement le GPA (high GPA) (figure 48B) que j'ai déterminé par la présence d'une double population pour le témoin sain. Nous observons que bien que les pourcentages de cellules présentant le marqueur GPA soient similaires pour le patient et le témoin sain, les résultats des diverses MFI sont différents. En effet, la MFI de la population high GPA pour le contrôle est de 36 683.85 contre 14 081.75 pour le patient ABD. En revanche, le contrôle a une MFI inférieure pour la population low GPA (620.77) comparé au patient ABD (824). Bien que le patient présente un pourcentage de 75,80% pour le marqueur GPA contre 71,95% pour le témoin, il a une MFI inférieure (883.5) à la MFI du contrôle sain (957.90). Ainsi, les cellules du patient ABD semblent posséder moins de GPA à leur surface pour la population étudiée que le témoin sain.

J'ai également porté mon étude sur deux autres marqueurs de différenciation : Band3, un marqueur tardif qui apparaît progressivement au cours de l'érythropoïèse et l'alpha-4 intégrine qui lui disparaît graduellement. Les résultats de cytométrie en flux exposent une diminution du pourcentage de cellules présentant à leur surface le marqueur BAND3 chez le patient ABD (7,36%) en comparaison au témoin sain (44,33%) (figure 48C-E). Un retard de la population générale dans l'acquisition du marqueur Band3 est dépeint au cours de notre analyse. Le pourcentage de l'alpha-4 intégrine (CD49d) est plus important chez le témoin sain (93,23%) que chez le patient (65.52%) (figure 48D-E). Cependant, l'étude de l'intensité de fluorescence nous permet de constater que la MFI est 6 fois moins important pour les cellules érythroïdes du témoin (1032) que pour les cellules érythroïdes du patient (6347). Ainsi, bien que plus de cellules du témoin présentent au moins une alpha-4 intégrine à leur surface, les cellules

semblent posséder moins de cellules pourvu d'une densité supérieure d'alpha-4 intégrine. Les cellules du témoin semblent perdent petit à petit leur alpha-4 intégine.

L'analyse des marqueurs de différenciation chez le patient porteur de mutation *HSPA14* semble mettre en évidence un retard dans l'apparition du marqueur CD36 et Band3. Bien que la différence soit légère pour le marqueur CD36 (65,67% pour le patient et 92,68% pour le témoin), la présence du marqueur Band3 à la surface des cellules du patient (7,36%) est divisé par 8 par rapport au témoin (44,33%). De plus, les cellules du patient présentent davantage d'alpha-4 intégrine à leur surface que les cellules du témoin. Les cellules du patient ABD ne semble pas être différenciées au même stade que les cellules témoins. Cette conclusion est objectivée par une MFI plus important chez le patient pour le marqueur alpha-4 intégrine qui est censé diminuer au cours de l'érythropoïèse terminale accompagnée d'une MFI pour la GPA (totale et high) plus élevé chez le contrôle que le patient.



GPA	CONTRÔLE	ABD UPN#961
TOTALE	957,9	883,5
LOW	620	824
HIGHT	36 685,85	14 080,75

Alpha-4 intégrine	CONTRÔLE	ABD UPN#961
TOTALE	1032	6347

Figure 48 : Retard des marqueurs de différenciation à la surface des cellules érythroïdes issues des CD34^{+} au cours de la différenciation érythroïde chez le patient ABD porteur du variant *HSPA14* et un contrôle. (A) Histogramme du marqueurs GPA. (B) Histogramme de la GPA totale, high et low. (C) Histogramme de la Band3 (D) Histogramme de l'alpha-4 intégrine. (E) Dot plot des marqueurs Band3 et alpha-4 intégrine. En rose : Patient ABD (UPN#961), en bleu : contrôle sain.

d. Etude du cycle cellulaire : une distribution différente des cellules

Au cours de mes différentes analyses de la prolifération cellulaire, j'ai constaté une prolifération très diminuée objectivée par un faible nombre de division cellulaire. J'ai donc réalisé une étude du cycle cellulaire via la cytométrie en flux.

L'analyse des résultats de cette étude montre une distribution classique du cycle cellulaire avec une phase de croissance cellulaire et d'activité métabolique normale en G1 suivi

d'une phase de la réplication de l'ADN en S et d'une phase de préparation à la mitose en G2. Le pourcentage de cellules dans ces trois phases est respectivement de 41,43%, 56, 29% et 4,27% pour le contrôle et de 43,53%, 56, 47% et 2% pour le patient (figure 49A).

En revanche, l'étude du cycle cellulaire a permis de mettre en évidence un pourcentage 3 fois plus important de cellules en phase SubG1 chez le patient ABD (UPN#961) porteur du variant *HSPA14*, (33,07%) par rapport au témoin (10,61%) (figure 49 A-B). Il semble donc avoir une apoptose cellulaire augmenté chez le patient ABD en comparaison d'une condition normale du témoin sain. De plus, l'intensité de fluorescence dépendant de la quantité d'ADN est diminuée chez le patient (UPN#961 : en phase G1 : 597 et en phase S : 149) par rapport au témoin sain (CTL : en phase G1 : 877 ; en phase S : 219) alors que le nombre de cellules analysées est identique (figure 49B). Il semble donc qu'il y ait une diminution de la quantité d'ADN présent dans l'échantillon pouvant refléter une diminution du nombre de cellules entrant en mitose. Ainsi, la diminution de la prolifération des cellules peut être en partie expliquée par un nombre de cellules en apoptose qui augmente, objectivé par une augmentation du pourcentage de cellules en phase subG1.

A

PHASE	CONTRÔLE	ABD UPN#961
G1	41,43%	43,53%
S	56,29%	56,47%
G2	4,27%	2%

B

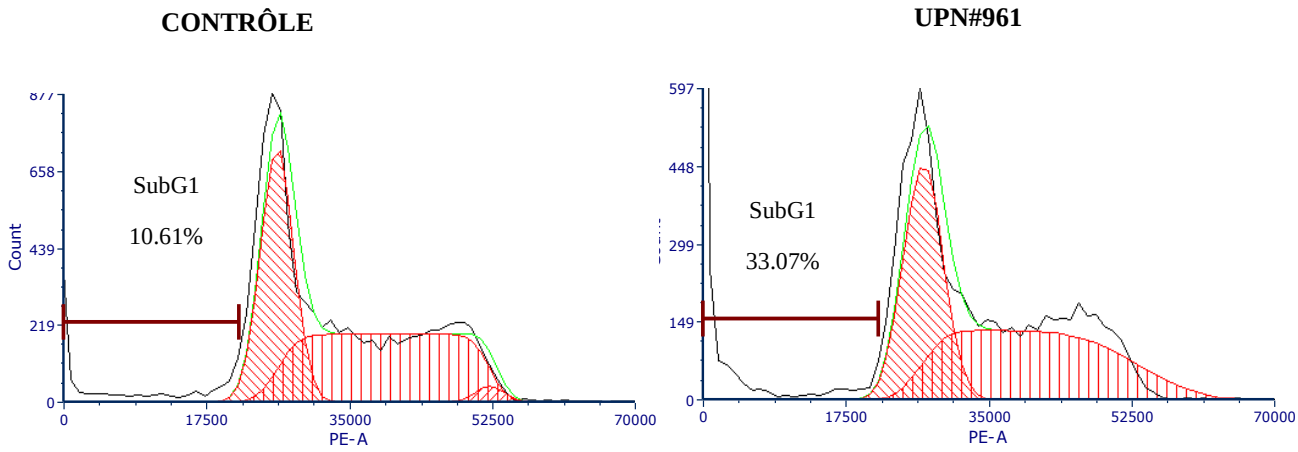


Figure 49: Cycle cellulaire chez le patient porteur du variant *HSPA14*. (A) Tableau des pourcentages des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. (B) Représentation de la distribution des cellules dans le cycle cellulaire chez le témoin (à gauche) et chez le patient ABD UPN#961 (à droite). Représentation des différents airs en fonction des différentes phases du cycle : en vert : allure générale du cycle cellulaire, en rayure rouge : représentation de nos résultats après normalisation.

3. Etude de la biogenèse du ribosome chez le patient atteint d'ABD porteur de variations alléliques du gène HSPA14.

L'anémie de Blackfan-Diamond est une érythroblastopénie présentant un défaut de maturation de l'ARNr. Cela est dû à une anomalie de la biogenèse du ribosome faisant de l'ABD une ribosomopathie. Dans cette optique, notre équipe a souhaité étudier la biogenèse du ribosome chez le patient ABD porteur de variants alléliques du gène *HSPA14*. Pour cela, j'ai fait établir une lignée lymphoblastoïde infectée par le virus EBV issue des lymphocytes B du patient ABD. L'utilisation de cette lignée permet de réaliser l'expérience souhaité en absence de cellules érythroïdes du patient. Une fois stable, j'ai récupéré notre ampoule de cellules pour les amplifier, réaliser notre stock et nos culots cellulaires. J'envoyais ensuite les culots cellulaires à nos équipes collaboratrices dont l'équipe du Pr PE. Gleizes afin de réaliser les études de maturation des ARNr par Nothern Blot et l'analyse du polysome. En parallèle, l'équipe collaboratrice du Pr PE. Gleizes a réalisé les mêmes analyses sur des cellules de la lignée HeLa ayant préalablement été infectées par un siARN porteur d'un variant *HSPA14* (représentant le patient ABD) ou d'un siARN scramble (présentant un témoin sain).

Les résultats d'analyse des polysomes dans les cellules lymphoblastoïdes montrent une diminution générale pour le profil des polysomes chez le patient ABD par rapport au contrôle. Nous observons une diminution importante du polysome 60S (grande sous-unité du ribosome) accompagnée d'une diminution du polysome 80S (ribosome). Cependant, le polysome 40S (petite sous-unité du ribosome) ne semble pas être impacté (figure 50A).

Afin de confirmer que l'observation de ce profil est dû à la présence d'un variant sur le gène *HSPA14*, l'équipe du Pr PE. Gleizes a produit deux siARNs porteur d'un variant *HSPA14*. Une fois validé, des cellules de la lignée HeLa ont été infectées par l'un de ces différents siARNs et le profil des polysomes a été réalisé. Les résultats montrent un profil similaire à celui précédemment obtenu avec une diminution générale du profil des polysomes suivant la même distribution. Les deux siARNs porteur d'un variant *HSPA14* entraînent une diminution du nombre de polysome 60S et 80S par rapport à la condition témoin (siARN scramble) (figure 50B). La variation allélique du gène HSPA14 induit donc un défaut dans la production de la grande sous-unité du ribosome conduisant à diminution de la formation du ribosome de 80S.

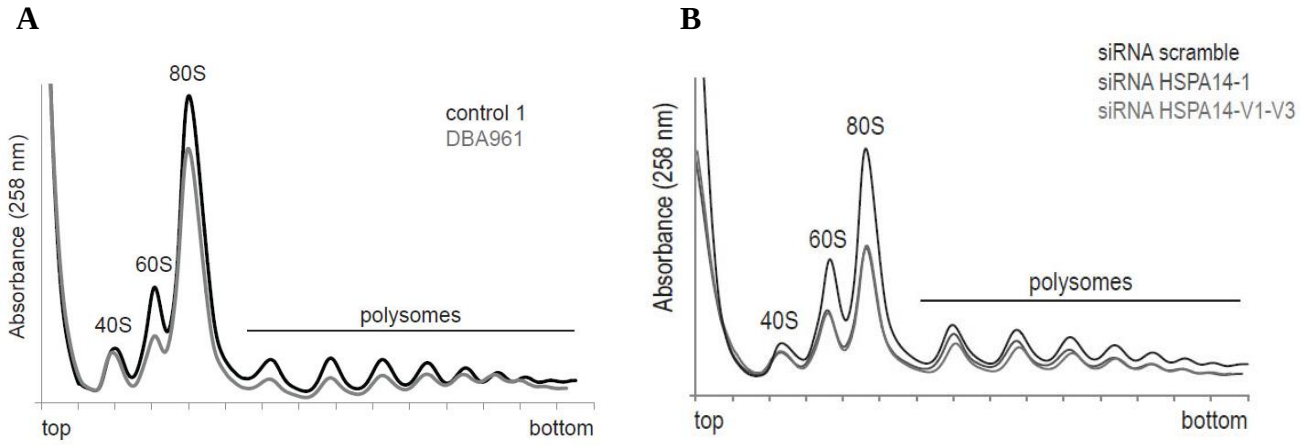


Figure 50: Le variant HSPA14 induit différents profils des polysomes. Données personnelles non publiées appartenant à l'équipe du Pr Pierre Emmanuel Gleizes et du Dr Marie François O'Donohue, université Paul Sabatier, Toulouse

Par l'observation des profils des polysomes et la constatation d'une diminution de la synthèse des polysomes 60S entraînant une diminution de la formation de ribosomes fonctionnels de 80S, l'équipe du Pr PE. Gleizes a réalisé les Notthern blot de ces mêmes échantillons afin d'étudier la potentielle variation du nombre des particules formant les polysomes 40S et 60S. Les résultats montrent une augmentation du nombre de particules 45S, 30S et 18S en présence d'un variant HSPA14 suggérant donc une accumulation de ces particules. A l'inverse, une diminution du nombre de particules 18S-E a été observé (figure 51A-B).

Tous ces éléments pris ensemble permettent d'affirmer un défaut dans la biogenèse du ribosome et notamment dans la maturation des ARNr.

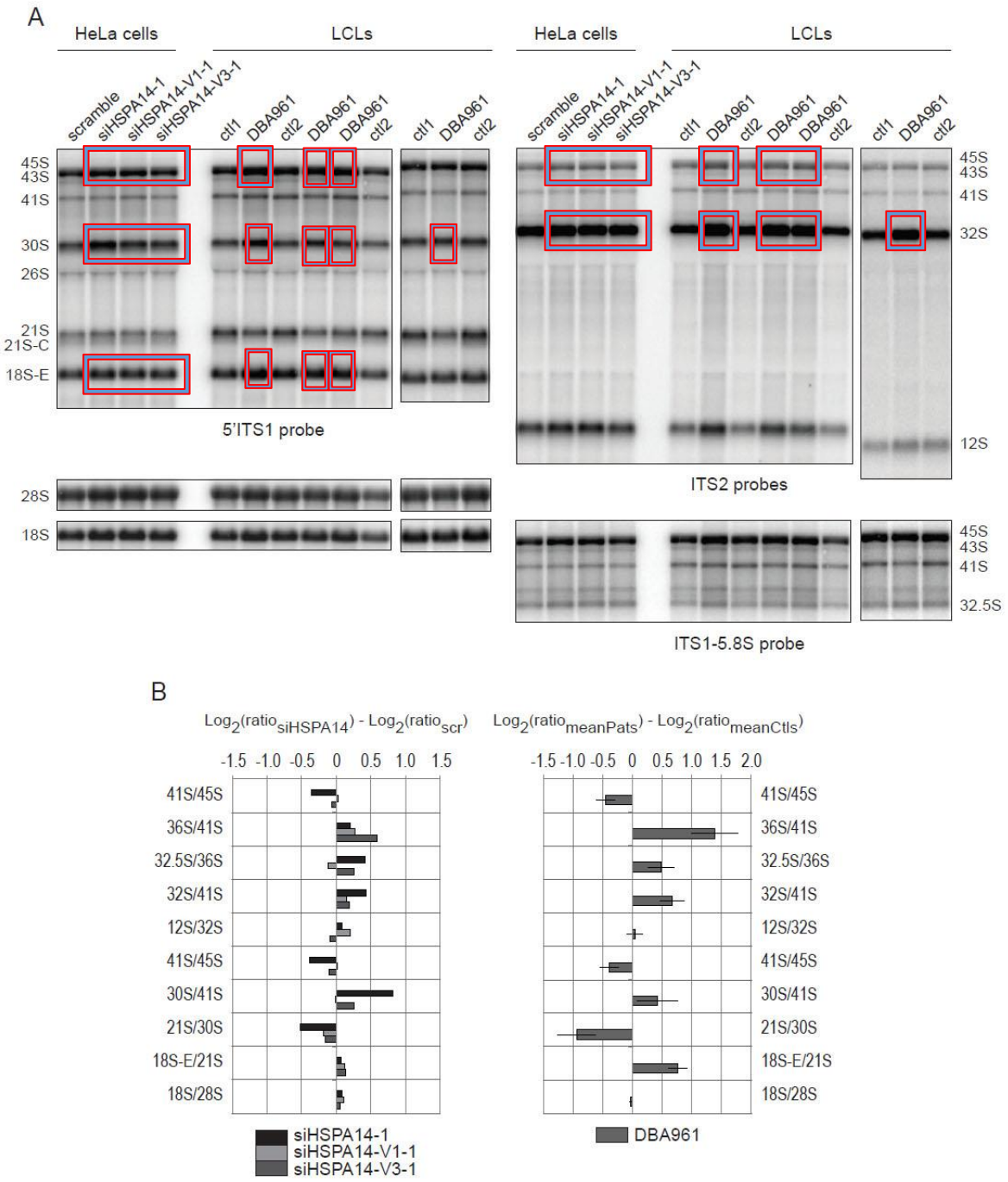


Figure 51: : Le variant HSPA14 présente des défauts dans le processus de biogenèse du ribosome. A) Analyses par Nother blot de cellules lymphoblastoïdes dérivées du patient ABD UPN#961 porteur du variant HSPA14 ou de cellules HeLa préalablement infectées avec un siARN porteur d'un variant HSPA14 ou d'un scramble. B) Quantification.

Données non publiées, appartenant à l'équipe du Pr Pierre Emmanuel Gleizes et du Dr Marie François O'Donohue, université Paul Sabatier, Toulouse

B. Une protéine chaperon de RP : HEATR3

Une équipe du consortium EuroDBA a initialement identifié un variant dans le gène HEATR3 dans une famille de la cohorte néerlandaise. Notre équipe a donc recherché au sein de la cohorte française si une ou plusieurs familles possédaient un variant pour ce gène.

1. Phénotype et génotype d'un cas particulier d'ABD

La deuxième famille étudiée pour une mutation codant une protéine chaperon consistait en un patient atteint d'ADB, de sexe masculin. Il est actuellement âgé de 11 ans et présente un diagnostic classique d'ABD présentant une érythroblastopénie. De plus, le patient montre à la fois un syndrome malformatif avec une communication inter-auriculaire, un retard staturo-pondéral important à -4DS pour la taille et -3DS pour le poids (sous hormone de croissance depuis 2012) et un syndrome digestif depuis ses 5 ans à type de diarrhées profuses avec des lésions ulcéreuses aux biopsies. Ces derniers symptômes ont été initialement mis sous le compte d'un effet secondaire du traitement par un chélateur en fer (exjade). Après l'arrêt du traitement en 2012, le syndrome digestif s'est poursuivi voire aggravé. Il a été mis sur le compte d'une maladie de Crohn atypique ou MICI like (traitement actuel : imurel). Il est actuellement transfusé régulièrement avec en association un autre chélateur en fer (desféral).

Au cours de notre analyse génétique, deux variations dans le gène *HEATR3* ont été identifiées à l'état hétérozygote composite : deux variants dans le gène *HEATR3* chromosome 16 : NM_182922.2 ;

- Un variant hétérozygote faux-sens de l'exon 6 : c.719C>T ; p.P240L – absent des contrôles (déjà vus = 0) ; CADD 23.5. Ce variant présente un score prédictif de l'impact fonctionnel par *Poly*phen2 délétère.
- Un variant hétérozygote d'un site d'épissage en position 50102779 ; 1 déjà vu à l'état hétérozygote ; CADD 25.3. Le score prédictif par *Polyphen2* et sift est délétère.

Nous avons réalisé une étude de la ségrégation familiale qui présente une ségrégation parfaite avec la mère ayant transmise la variation allélique hétérozygote faux-sens alors que le père a transmis la variation allélique du site d'épissage. Les deux parents ne sont pas atteints de l'anémie de Blackfan-Diamond. De façon tout à fait intéressante, ce patient atteint d'ABD présente également une variation de la région 5'UTR du gène *RPL9* (NM_000661.4 : c.-31A>T ; p. ?) qui pourrait expliquer sa symptomatologie digestive comme celle rencontrée chez

le patient hollandais sus-décrit dans l'article paru dans Nucleic acid research (variation c.-2+1G>C (NM_000661.4)). Cependant, HEATR3 a été décrit comme impliqué dans la maladie de Crohn (Maouche et al., 2008). Cette variation (NM_000661.4 : c.-31A>T ; p. ?) de *RPL9* ne suffit pas néanmoins à expliquer l'ABD (variation présente à l'état homozygote chez un contrôle).

2. Etude de l'érythropoïèse dans les cellules primaires *ex vivo* de la famille du patients ABD porteurs de variations alléliques du gène *HEATR3*

a. Nombre de cellules CD34+

Pour étudier l'érythropoïèse chez le patient ABD porteur de variation alléliques dans le gène HEATR3, j'ai réalisé des cultures primaires des cellules $CD34^+$ issues de sang périphérique du patient mais également de ses deux parents qui présentent chacun une variation. Les prélèvements ont été réalisés à Albi ou à Paris selon le lieu d'hospitalisation du patient. Les cellules $CD34^+$ sont extraites à J0 à partir de PBMCs obtenus à la suite d'un gradient de ficoll effectué sur sang total issus des prélèvements du patient, de membres de sa famille et d'un témoin sain. Les cellules $CD34^+$ sont mises en culture à raison de 100 000 cellules /ml selon le protocole précédemment énoncé.

Comme attendu, le nombre total de PBMC n'est pas impacté par la maladie ni la présence d'une mutation dans un gène de protéine chaperon. La nombre de PBMCs rapporté au volume de sang obtenus chez le patient ABD (UPN#603) porteur de la mutation HEATR3 est de 4,9 x 10^6 (en nombre de PBMCs/ml) et de 4,95 x10^6 chez le témoin sain (en nombre de PBMCs/ml) et de 5 x10^6 et 6,5 x10^6 chez les parents (respectivement la mère (UPN#700) et le père (UPN#697)). Le nombre de PBMCs du patient ABD est quasi-similaire aux différents donneurs sains (figure 52A). Cependant, contrairement aux différents autres patients atteints d'ABD, et porteur de mutation en lien avec le ribosome, qui ont été étudié au cours de ma thèse, le nombre de cellules $CD34^+$ issues des PBMCs du patient ABD UPN#603 est légèrement plus élevé que le témoin et l'un des parents (figure 52B). En effet, le nombre de $CD34^+$ obtenues chez le patient ABD est de 10 000 cellules/ml alors qu'il est de 8 444 cellules/ml chez le témoin sain, de 7 555 cellules/ml chez la mère et de 16 444 cellules/ml chez le père. De plus, le pourcentage de cellules $CD34^+$ extraites chez le patient ABD (0.20%) calculé à partir du nombre total de PBMC isolés par gradient de Ficoll est proche de celui des différents témoins (0.17% pour le CTL ; 0.15% pour la mère et 0.27% pour le père) (figure 52C). Il faut cependant noter

que le patient UPN#603 était seulement âgé de 9 puis 10 ans lors des prélèvements alors que le reste des échantillons reçus proviennent d'adultes âgés de 35 ans à 52 ans.

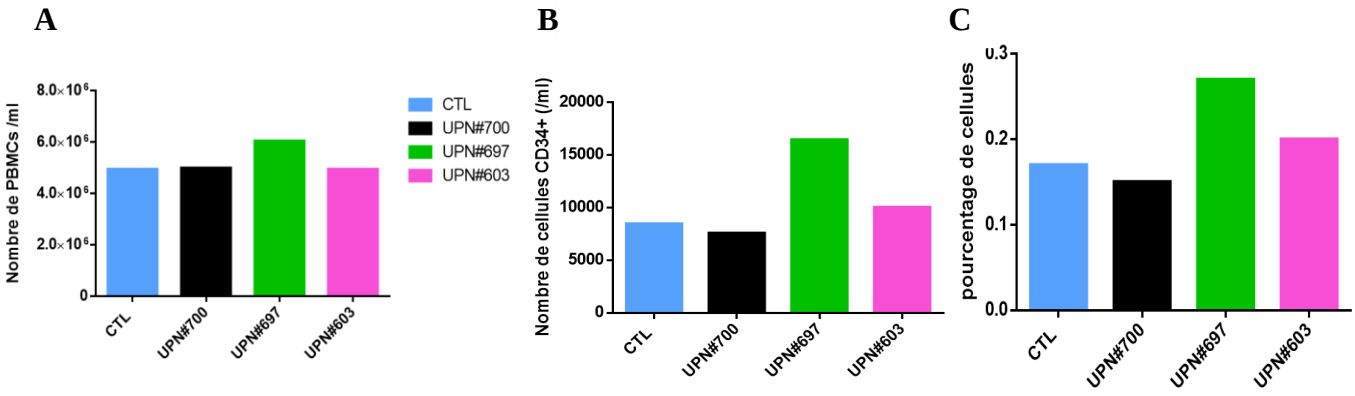


Figure 52: : Nombre de cellules CD34+ extraites après isolement de PBMCs à partir de sang total de patient ABD (UPN#603) ou de témoins (CTL, UPN#700, UPN#697). (A) Nombre de PBMCs (/ml) issues du sang total chez le patient ABD et les témoins sain. (B) Nombre de cellules $CD34^+$ extraites (/ml) après isolement des PBMCs (C) Pourcentage des cellules $CD34^+$ extraites après isolement des PBMCs

b. Etude de la prolifération des cellules $CD34^+$ mises en culture

Les cultures primaires de $CD34^+$ ont été réalisées par 3 fois sur 5 et 7 jours pour ce patient mais j'ai conservé que les deux résultats des cultures menées jusqu'à un jour d'intérêt dans notre protocole (jour 7). Je n'ai jamais pu aller au-delà par manque de cellules vivantes issues du patient. Lors de chaque réception des prélèvements, l'échantillon de sang du patient présentait une couleur rouge-noir avec une consistance opaque (possible coagulation) alors que les autres échantillons étaient plus fluides et rouges foncés.

La viabilité cellulaire est réduite chez les patients ABD par rapport au témoin. Durant l'étape d'extraction cellulaire, la viabilité cellulaire du patient s'élève à seulement 60.72% en moyenne alors que celles des contrôles avoisinent les 70% (figure 53A). De plus, au cours de la culture des cellules $CD34^+$ en différenciation, de nombreux débris cellulaires sont observables au microscope. Il est impossible de les dénombrer ce qui fausse l'évaluation de la viabilité cellulaire. La présence de ces débris nous informe d'une possible augmentation de mort cellulaire chez ce patient.

L'étude de la prolifération cellulaires des CD34$^+$ issues du patient ABD UPN#603 porteur des variations alléliques *HEATR3* m'a permis de mettre en évidence une diminution de la croissance cellulaire. En effet, alors que le jour de la mise en culture, les valeurs du nombre de cellules sont quasiment similaires (ln de 12.39 pour le témoin sain (CTL), ln de 11.83 pour la mère (UPN#700), ln de 12.66 pour le père (UPN#697) et ln de 11.97 pour le patient(UPN#603)) celle du patient va diminuer au cours de la différenciation pour atteindre une valeur de 10.61 (en ln) et celles des témoins va croître pour atteindre une valeur supérieur à 13(en ln) (avec respectivement des valeurs de 14.11, 14.37 et 13.34 pour le témoin sain, la mère et le père) (figure 53B).

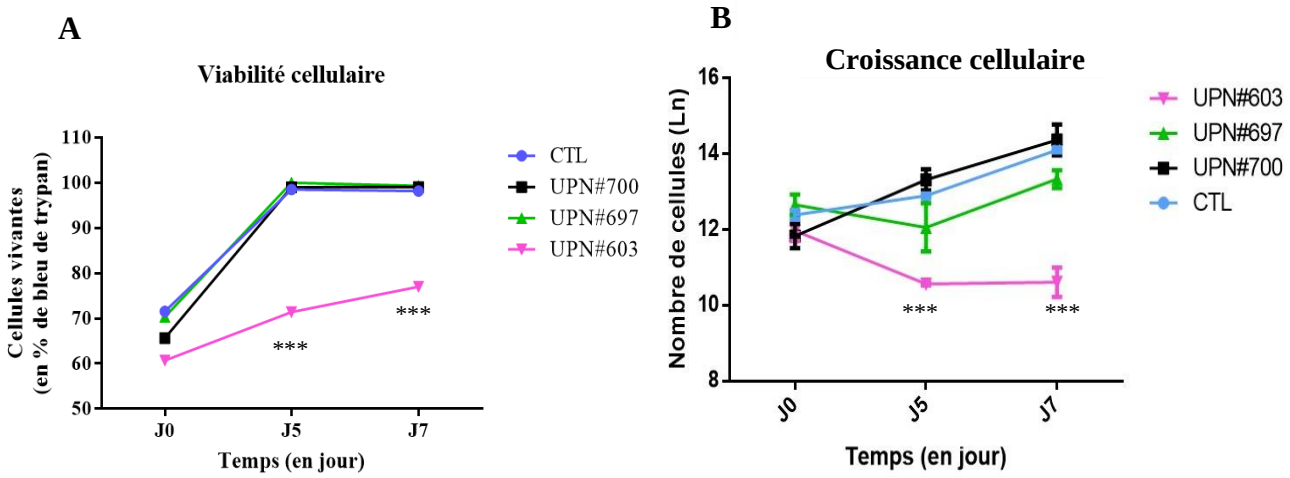


Figure 53 : Défaut de prolifération cellulaires des cellules érythroïdes issues de CD34$^+$ issues de sang périphérique de patient ABD (UPN#603) portant deux variations hétérozygotes composites du gène *HEATR3* et de témoins. (A) Courbe de viabilité cellulaire calculé avec une coloration au bleu de trypan à 0.2%. (B) Courbe de croissance des cellules CD34$^+$ en différenciation érythroïde *ex vivo*. Moyennes et écart-types de deux expériences indépendantes. ***=P <0.001

Tout comme pour les autres patients, je me suis intéressée au facteur d'amplification des cellules érythroïdes issues des CD34$^+$ mises en culture et au nombre de division cellulaire qu'elles subissaient entre chaque jour d'intérêt. La moyenne du facteur d'amplification des deux expériences de différenciation érythroïde varie d'un facteur 7 entre le patient (UPN#603) et le témoin sain (CTL) entre le jour 0 et le jour 5 et d'un facteur de 2.6 entre le jour 5 et le jour

7 (figure 54A). De plus, le nombre de divisions cellulaires est également réduit par 23 à 28 fois chez le patient ABD en comparaison des différents témoins. Par exemple, la moyenne du nombre de division cellulaire du témoin (CTL) est de 1.75 alors que celle du patient est de 0.065 (figure 54B).

Les variations alléliques présentent sur des gènes codant une protéine chaperon HEATR3 identifiées chez le patient ABD semblent induire un défaut de l'érythropoïèse. En effet, une anomalie de prolifération cellulaire importante chez le patient avec une viabilité cellulaire diminuée accompagnée de nombreux débris cellulaires au cours de la culture *ex vivo* ont été observée au cours des différentes expériences. Le facteur d'amplification est également réduit. Il en est de même pour le nombre de divisions cellulaires pouvant être divisé par 28 chez le patient.

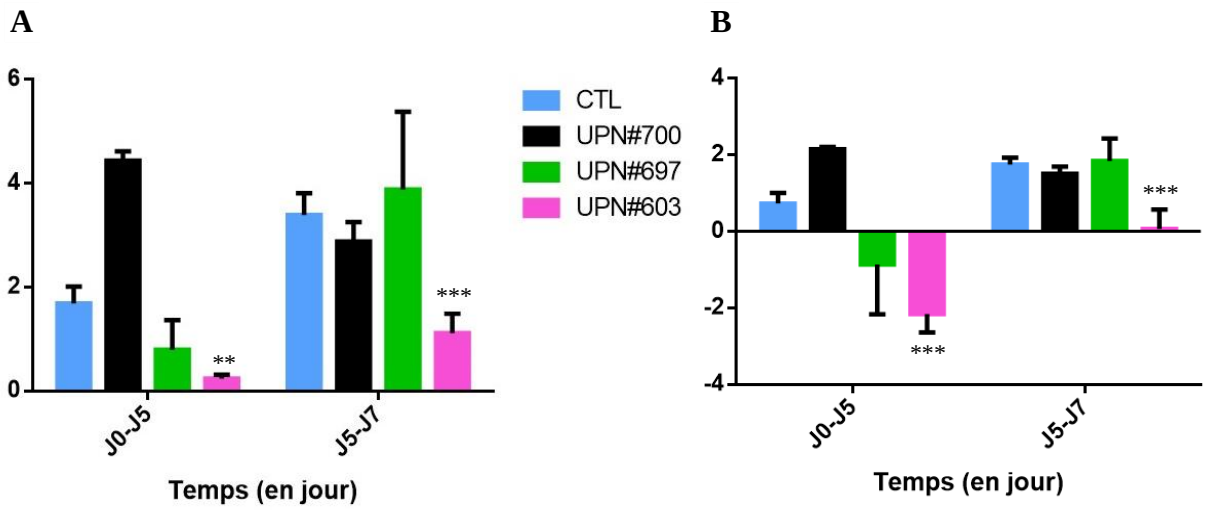


Figure 54: : Défaut d'amplification et de division cellulaire des cellules CD34+ issues de sang périphérique du patient UPN#603 et de témoins (CTL) en cours de différenciation érythroïde. (A) Facteur d'amplification des cellules érythroïdes. (B) Nombre de division cellulaire des cellules érythroïdes. Moyennes de deux expériences indépendantes pour le patient UPN#603. **=P <0.01 ; ***=P <0.001

c. Etude des marqueurs de surface au cours de la différenciation érythroïde *ex vivo*

J'ai réalisé des analyses de cytométrie en flux sur des cellules érythroïdes issues de $CD34^+$ en culture afin d'étudier la présence ou non de différents marqueurs de l'érythropoïèse. La faible prolifération et viabilité des cellules mises en culture ne permettent pas de réaliser l'analyse de tous nos marqueurs de différenciation au cours de la même expérience. Il m'a fallu un échantillon de sang périphérique et une mise en culture des cellules $CD34^+$ pour chaque technique d'analyse. Je n'ai malheureusement pas reçu assez d'échantillon pour réaliser toutes les analyses que j'envisageais. Cependant je me suis intéressée aux marqueurs d'immaturité de la différenciation érythroïde. Bien que la faible quantité de cellules ait diminué l'optimisation des résultats de cytométrie en flux, j'ai pu réaliser quelques observations. J'ai pu réaliser une étude des marqueurs de différenciation uniquement à J7 de notre protocole de différenciation. A ce stade de la différenciation érythroïde (J7), tous les contrôles (témoin sain et les deux parents) sont négatifs pour le marqueur CD34 alors qu'il est positif à plus de 90% pour le patient (figure 55A). Il en est de même pour le marqueur IL3-R qui est fortement exprimé chez le patient (76,85%) alors qu'il est quasi inexistant chez les divers témoins (0,21% pour le témoin sain, 0,1% pour la mère et 0,04% pour le père) (figure 55B). En revanche, le patient possède un pourcentage de cellule présentant le CD36 (UPN#603 : 35,52%), un marqueur de la différenciation, proche de celui des différents témoins (UPN#700 : 38,33% ; UPN#697 : 25,97 ; contrôle : 39,16%) (figure 55C). En condition normale, les marqueurs d'immaturité CD34 et IL-3R doivent disparaître au début de la différenciation érythroïde alors que le marqueur de différenciation CD36 doit être fortement exprimé entre J7 et J12. En condition pathologique, les cellules du patient ABD porteur de variants *HEATR3* montrent une persistance de l'IL3-R accompagné d'un fort pourcentage de cellules portant le marqueur d'immaturité CD34.

En conclusion, nos résultats semblent montrer un retard dans la disparition des marqueurs d'immaturité telles que les marqueurs CD34 et IL3-R chez le patient porteur de deux variants du gène *HEATR3*. En parallèle, l'apparition du marqueur de différenciation CD36 est similaire pour la condition normale et la condition pathologique. Les variations alléliques de *HEATR3* ne semblent pas affecter l'apparition du marqueur $CD36^+$ chez le patient.

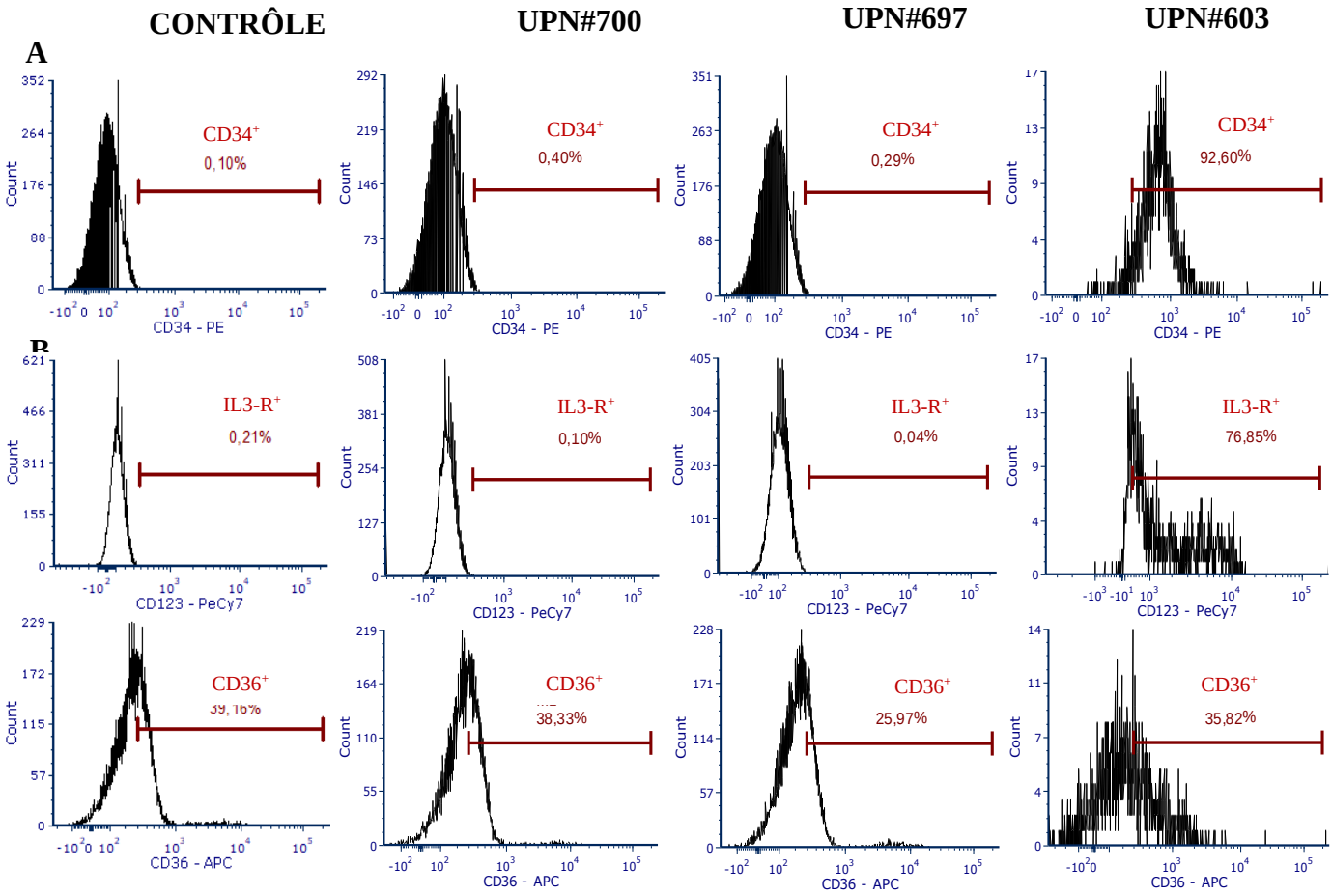


Figure 55: Persistance des marqueurs d'immaturité à la surface des cellules érythroïdes issues des CD34+ au cours de la différenciation érythroïde chez le patient ABD porteur des variations alléliques de *HEATR3*. (A) Histogramme des marqueurs CD34. (B) IL3-R et (C) CD36 des cellules en différenciation érythroïde du patient ABD (UPN#603) et d'un témoin (CTL) et deux apparentés (UPN#700 et UPN#697) à J7.

3. Etude de l'expression des protéines chez le patient porteur de mutation sur un gène codant pour un chaperon de ribosome, HEATR3

HEATR3 est une protéine qui chaperonne deux protéines ribosomiques. Elles vont s'incorporer à la sous-unité 60S du ribosome. Notre équipe pensait que la présence d'une mutation sur le gène codant pour un chaperon de deux RP pourrait induire un défaut d'assemblage du ribosome qui mènerait à un stress ribosomique et donc à une stabilisation de la protéine p53. J'ai voulu vérifier cette hypothèse en réalisant une étude du niveau d'expression de la protéine p53 ainsi que l'une de ces cibles p21 qui permet une régulation fine du cycle cellulaire.

Le niveau d'expression des protéines a été quantifié par la méthode de Stain-Free que j'avais récemment développé au laboratoire. Cette technique utilise la quantité totale de protéines déposées sur le gel pour quantifier leur expression (figure 56A).

Limité par le nombre de cellules érythroïdes lors des différentes cultures, j'ai réalisé au préalable nos études de l'expression des protéines sur la lignée des cellules lymphoblastoïdes issues du patient UPN#603 et du témoin UPN#700. En utilisant des anticorps ciblant la protéine p53 et p21 j'ai observé que le niveau d'expression de la protéine p53 est augmenté par 9.6 chez le patient par rapport au témoin et par 36.2 pour la protéine p21 (figure 56B-C). La forte augmentation de la protéine p21 chez le patient correspond vraisemblablement à l'activation de la p53 et pourrait induire un arrêt du cycle cellulaire.

Un défaut de formation de la particule 60S dû à une mauvaise incorporation des protéines Rpl5 et RPl11 par absence ou anomalie de leur chaperon HEATR3 pourrait induire un ralentissement du turnover des protéines et jouer sur l'intégrité des protéines néoformées. Je me suis intéressée à la protéine chaperon HSP70 dont l'un de ses rôles est d'assurer le bon repliement de ces protéines. L'expression protéique de HSP70 est augmentée chez les cellules lymphoblastoïdes du patient porteur de variants *HEATR3* ce qui est inattendu (figure 56B-D). En effet, notre équipe avait précédemment démontré que la diminution de l'expression de HSP70 était spécifique de la lignée érythroblastique lorsque les mutations affectaient une protéine ribosomique. De ce fait, cette diminution n'était pas observée dans les lignées lymphoblastoïdes établis chez des patients possédant une mutation dans un gène de RP. Or au cours de nos analyses, j'ai trouvé un ratio de 25,7 fois pour le patient par rapport à celui du témoin (figure 56D). Le profil protéique de HSP70 indique une traduction importante du

chaperon dans les cellules lymphoblastoïdes. Ainsi, en réponse à la mutation d'un chaperon de RP pouvant induire un défaut ribosomal, la synthèse de la chaperon HSP70 est augmentée. Cela pourrait être expliqué soit par son action contre le repliement des protéines pour assurer le maintien leur bonne conformation, soit pour protéger les protéines de l'agrégation, soit être dû à un problème de traduction de la protéine qui serait mal synthétisée.

Enfin, mes analyses de la différenciation érythroïde montrent une présence importante de débris cellulaires. Les cellules du patient semblent être très susceptibles à la mort cellulaire. Je suis allée observer si l'apoptose ou la nécrose étaient activées. Pour cela j'ai utilisé des anticorps ciblant la caspase 3, PARP et Bcl-xL. Mes résultats montrent une augmentation de l'expression de ces 3 protéines chez le patient à des ratios différents. En effet, la caspase 3 et PARP sont respectivement 3,6 et 3,7 fois supérieur chez le patient ABD par rapport au contrôle alors que Bcl-xL l'est de 1,32 (figure 56B-E). Ces résultats amènent de nouvelles hypothèses sur la présence de ces nombreux débris. Une suractivation de la protéine PARP peut induire un mort cellulaire par nécrose. De plus, PARP est inactivée à la suite de son clivage par la caspase-3 active lors d'un processus d'apoptose. La caspase-3 active peut également cliver GATA-1 ce qui inhibe l'activation de Bcl-xL. Ainsi, la surexpression de PARP totale peut être due à une induction de la mort cellulaire par nécrose. En réponse, la caspase 3 est surexprimée. On peut émettre l'hypothèse que cela peut également entraîner une surexpression du chaperon HSP70 afin de protéger GATA-1, une cible de la caspase-3 expliquant ainsi la légère surexpression de la protéine Bcl-xL.

En conclusion, j'ai souhaité confirmer l'activation des différentes voies cellulaires impliquées dans la maladie en étudiant le niveau d'expression des protéines impliquées dans la mort cellulaire telles que l'apoptose ou la nécrose dans des cellules érythroïdes issues du patient et d'un témoin. Plusieurs voies peuvent être activées au cours de l'ABD. La protéine p53 est stabilisée au cours de la maladie, à la suite d'une mutation d'une protéine ribosomique entraînant un stress ribosomal. La protéine p53 va réguler différentes voies via l'interaction avec diverses protéines comme la p21 qui permet une régulation fine du cycle cellulaire. La mort cellulaire des cellules érythroïdes peut être une conséquence de l'activation de la p53, d'un défaut de HSP70 entraînant le clivage de GATA-1 ou de sa surexpression, c'est pourquoi je me suis également intéressée à la caspase-3 ainsi qu'à Bcl-xL. Ces données corroborent les observations faites lors de la culture cellulaire avec une présence importante de cellules mortes ou de débris cellulaires résultant d'une mort cellulaire plus importante.

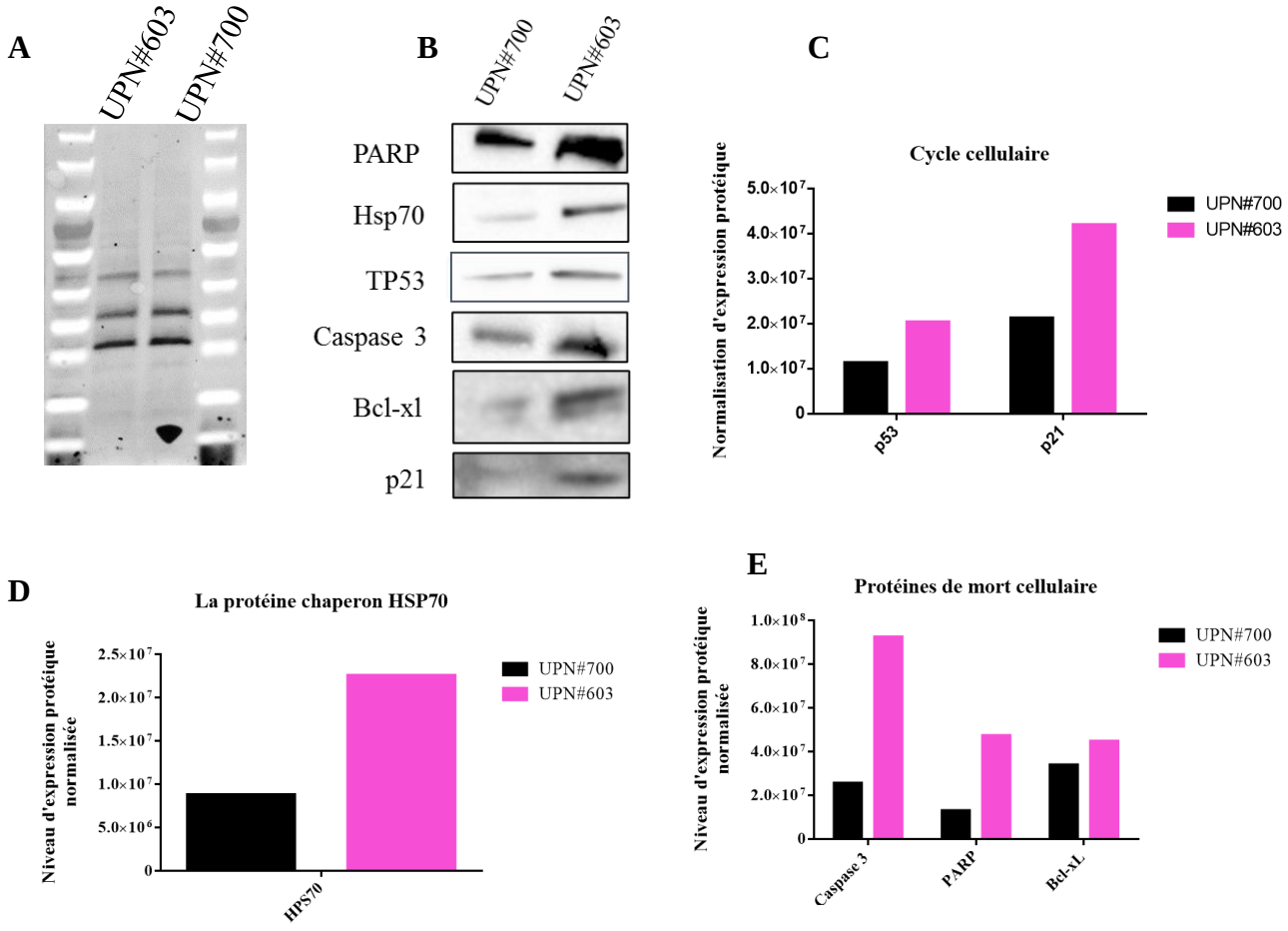


Figure 56: Etude de l'expression des protéines dans la lignée lymphoblastoïdes issues des cellules du patient UPN#603 et d'un contrôle. (A) Réalisation des Western blot par gel Satin-free. Dépôt protéique sur gel Stain-free pour quantification. (B) Expression de différentes protéines d'intérêts. (C) Etude du niveau protéique de la protéine p53 et de l'un de ses cibles : p21 régulant le cycle cellulaire. (D) Etude du niveau protéique de la protéine chaperon HSP70. (E) Etude du niveau protéique de protéines de différentes voies de signalisation de mort cellulaire

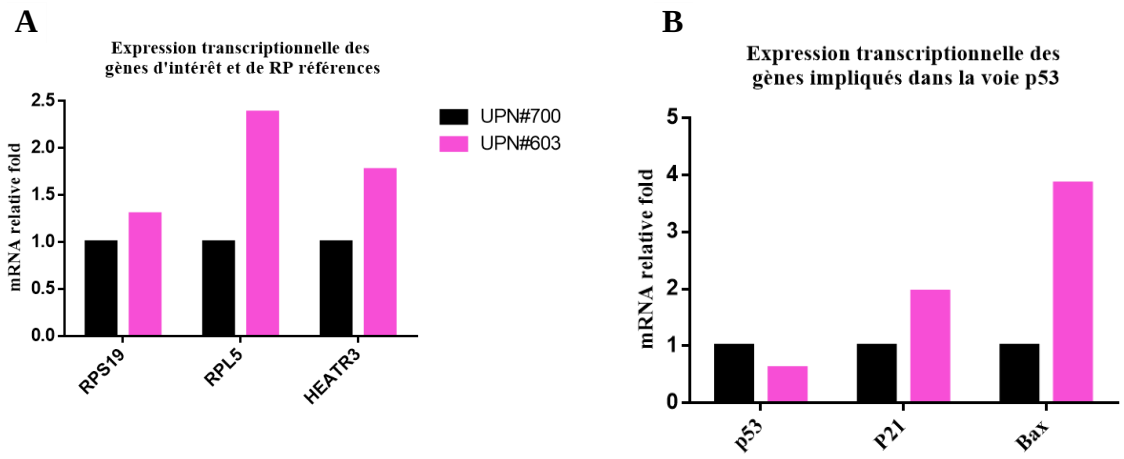
4. Etude de l'expression des gènes chez le patient porteur de mutation sur un gène codant pour un chaperon de ribosome, *HEATR3*

    a. Dans les lignées lymphoblastoïdes infectées par EBV obtenues à partir de cellules lymphocytaires de la famille

J'ai voulu connaître si la mutation identifiée induisait une altération de la transcription de la protéine d'intérêt. Pour cela, le niveau transcriptionnel de la protéine chaperon a été étudié dans la lignée lymphoblastoïde établie à partir de cellules du patient UPN#603 et du témoin UPN#700. J'ai utilisé des sondes ciblant HEATR3. Les résultats montrent de façon surprenante une légère augmentation (par 1,77) du niveau d'ARNm de HEATR3 chez le patient (figure 57A).

J'ai voulu regarder si l'expression transcriptionnelle d'une des protéines cibles de HEATR3 était impactée par les variants alléliques de *HEATR3*. J'ai également étudié si l'expression transcriptionnelle de RPS19 était modifiée. La transcription de RPS19 est légèrement modifiée mais n'est pas significativement impactée par les variations alléliques de HEATR3 (niveau transcriptionnel de 1.3 pour le patient contre 1 pour le témoin) alors que celle de RPL5 est plus élevé chez le patient par rapport au témoin (niveau transcription de 2.38 pour le patient contre 1 pour le témoin) (figure 57A).

En vue des résultats obtenus par Western blot pour la protéine p53 et sa cible p21, je me suis intéressée à leur niveau transcriptionnel. Les résultats montrent une augmentation du niveau transcriptionnel pour deux protéines cibles de p53 : la protéine p21 (par 1,95) et la protéine pro-apoptotique bax (par 3,85) chez le patient. A l'inverse, l'expression de l'ARNm de p53 est légèrement diminuée (avec une valeur de 0,61) (figure 57B). L'activation transcriptionnelle de p21 peut induire une augmentation de l'expression de la protéine qui est responsable de l'arrêt des cellules en phase G_0 du cycle cellulaire. De plus, l'augmentation du niveau transcriptionnel de bax pourrait signifier une activation de la voie des caspases. En effet, la protéine pro-apoptotique bax est une cible de la caspase-3. Des études de l'apoptose par cytométrie en flux ou de l'expression des protéines clivées de l'apoptose seraient nécessaires pour le confirmer complétement.



	UPN#700	UPN#603
P53	1	0,61
P21	1	1,95
Bax	1	3,85
RPS19	1	1,3
RPL5	1	2,38
HEATR3	1	1,77

Figure 57 : Expression transcriptionnelle des différents gènes dans les cellules lymphoblastoïdes issues du patient ABD UPN#603 et du témoin UPN#700. (A) Expression transcriptionnelle du gène d'intérêt, d'une de ces cibles (RPL5) et d'une RP de référence. (B) Expression transcriptionnelle des différents gènes impliqués dans la voie p53 (p21 et Bax). Témoin contrôle fixé arbitrairement à 1 pour chaque gène. Gène rapporteur : actine β

J'ai regardé si j'obtenais les mêmes résultats dans les cellules érythroïdes du patient atteint d'ABD muté HEATR3 que dans la lignée lymphoblastoïde. Des cultures primaires de $CD34^+$ issues de sang périphérique de patient, de sa famille et d'un témoin ont été réalisées. La culture des $CD34^+$ a été effectuée sur 7 jours afin d'étudier le profil d'expression transcriptionnelle de nos protéines d'intérêts. Malheureusement, la faible prolifération et viabilité cellulaire du patient nous a contraint de sélectionner les gènes à étudier. En effet, avec une quantité d'environ 22 000 cellules pour le patient, seulement 100 ng d'ARN total a pu être extrait contre plus de 1.8 µg pour certains témoins. Je me suis donc focalisée sur la protéine dont le gène porte une mutation ainsi qu'une protéine de référence : RPS19. Nous avons normalisé les résultats par rapport à l'actine.

Les résultats obtenus montrent une répression transcriptionnelle chez le patient ABD UPN#603 porteur de variations alléliques de *HEATR3* et de manière moins prononcée chez les apparentés (UPN#700 et UPN#697) porteurs d'un variant de HEATR3 par rapport au témoin sain (CTL) (figure 58). Les résultats sont contraires à ceux obtenus dans les cellules lymphoblastoïdes infectées par EBV du patient qui elles présentaient une augmentation du niveau transcriptionnel de *HEATR3*. En revanche, l'expression du gène *RPS19*, utilisé comme contrôle est comme attendu augmenté par 3 chez le patient ABD UPN#603 en comparaison du témoin sain. Les apparentés présentent également une augmentation de l'expression transcriptionnelle du gène *RPS19*, il est moindre que le patient ABD (figure 58).

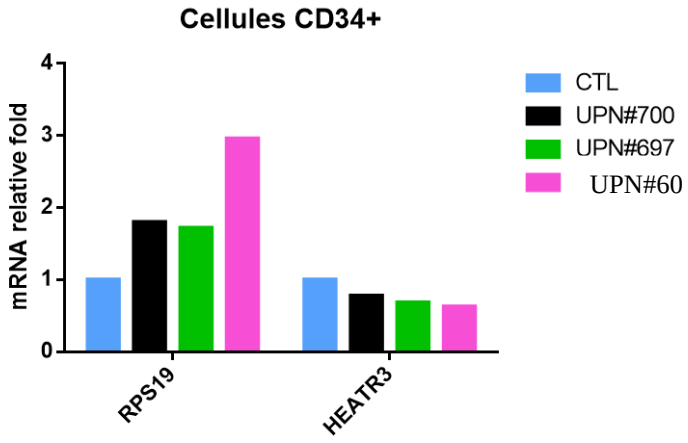


Figure 58: Expression transcriptionnelle des différents gènes dans les cellules CD34$^+$ mises en cultures et issues du patient ABD UPN#603 porteur du variant HEATR3, de ses apparentés (UPN#700 et UPN697) et d'un témoin sain. Expression transcriptionnelle du gène d'intérêt *HEATR3*, du gène de référence *RPS19*. Normalisation des résultats par le gène de ménage *ACTINE B*.

Les différents profils protéiques observés dans les cellules lymphoblastoïdes correspondent aux différentes observations réalisées par notre groupe dans ce type de cellule. On observe une activation des différentes voies médiées par la p53 avec activation de la p21 (ARNm et protéine) et bax (ARNm) responsable de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G_0. Il sera nécessaire de le confimer par l'étude de la p53 phosphorylée. Il semble intéressant de vérifier dans les cellules érythroïdes, l'expression de la protéine GATA-1 et de celui de la HSP70 lors des prochaines expériences au vu du niveau protéique obtenu pour HSP70. Afin de

vérifier l'hypothèse que la synthèse de la protéine chaperon HSP70 puisse être augmenter dans la finalité de chaperonner les protéines afin de limiter leur répliement ou les protéger contre l'aggrégation induite par à des anomalies du ribosome, une étude d'autres chaperons tels que HSP90 et HSP60 serait intéressante.

5. Etude de la biogenèse du ribosome chez le patient atteint d'ABD porteur de variations alléliques du gène *HEATR3*

L'équipe de PE. Gleizes a réalisé l'étude de la maturation des ARNr par Nothern blot et l'analyse du polysome sur des échantillons de cellules lymphopblastoïdes.

Les résultats d'analyses des polysomes montrent une réduction importante de la particule 60S (grande sous-unité du ribome) induisant une diminution du polysome 80S (ribosome). La particule 40S ne semble pas être impacté par la présence de variants *HEATR3 (*figure 59).

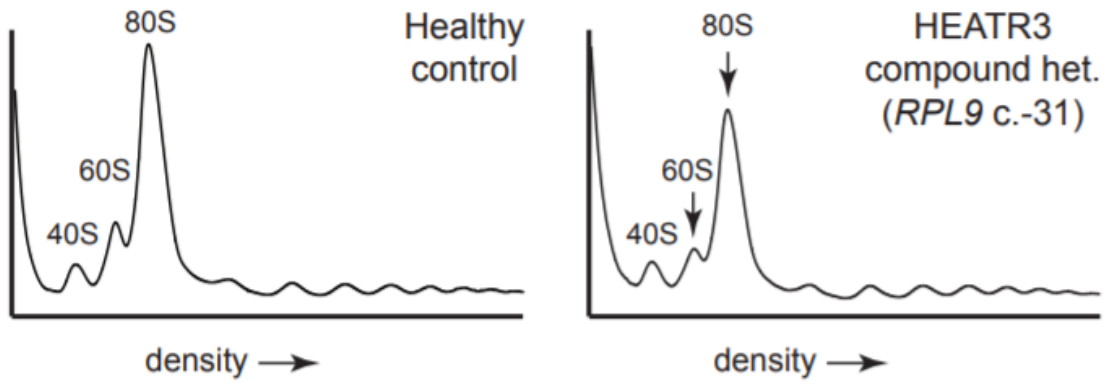
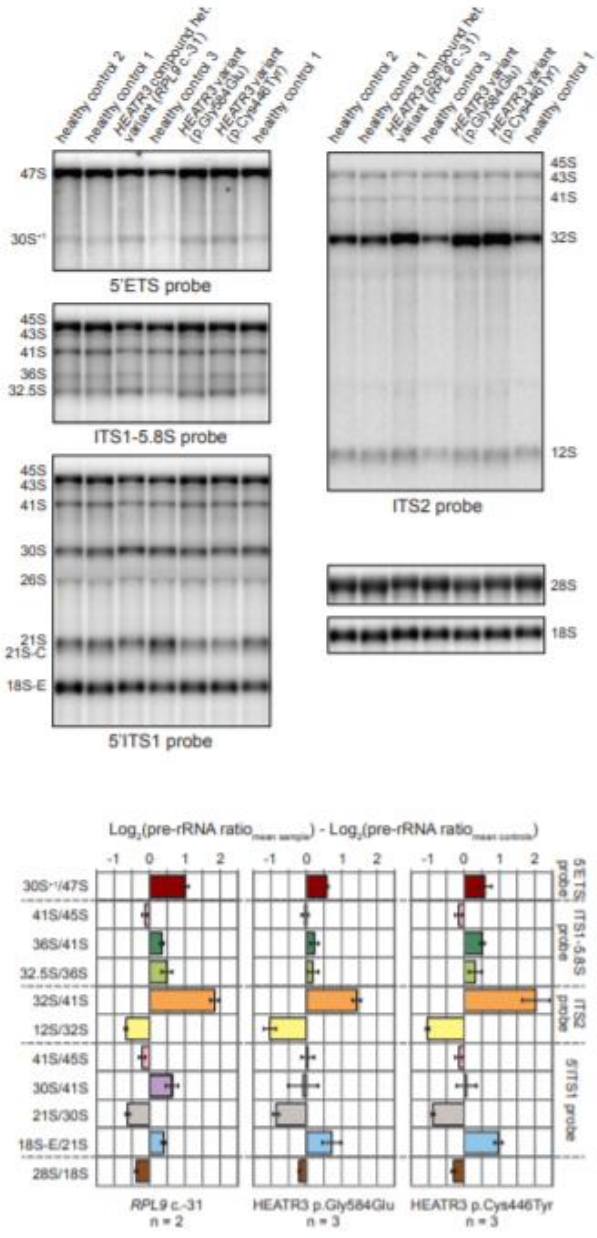


Figure 59: Le variant HEATR3 induit différents profils des polysomes. Données personnelles non publiés appartenant à l'équipe du Pr PE. Gleizes et du Dr Marie François O'Donohue, université Paul Sabatier, Toulouse.

A la suite des résultats obtenus au cours de l'analyse des différents polysomes et l'observation d'une diminution de la particule 60S entrainant une réduction du polysome 80S, l'équipe a réalisé les Nother blot. Les résultats montre d'une part une augmentation importante des particules 32S et une moins importante de la 21S ; d'autre part, une diminution des particules 30S et 36S en présence de variantS *HEATR3 (*figure 60).



P1: RPL9 c.-31 (DBA903)
P2: CA
P3: KAE

Figure 60: Les variants HEATR3 présentent des défauts dans le processus de biogenèse du ribosome. (A) Nothern blot de cellules lymphoblastoïdes dérivés du patient ABD. (B) Quantification.
Données non publiées, appartenant à l'équipe du Pr PE. Gleizes et du D MF O'Donohue, université Paul Sabatier, Toulouse.

III. Un nouveau gène identifié chez des patients diagnostiqués ABD ayant une érythroblastopénie mais non responsable d'une ribosomopathie

A. Identification d'un nouveau gène sans lien avec la biogenèse du ribosome ou l'érythropoïèse

1. Phénotype et génotype des patients

Au cours de nos recherches exomiques sur les 25 trios de familles françaises, nous avons identifiés des variants au sein du gène *CECR1* chez deux familles françaises. Grâce au consortium international EURODBA et à nos différentes collaborations nous avions pu confirmer la présence de ces variations alléliques chez plusieurs patients. De manière intéressante, nous avons identifié deux variations hétérozygotes composites. Chacun des parents est porteur d'une variation allélique du gène et la transmission est autosomale récessive. Les patients français ont été diagnostiqués durant l'enfance. Tous les patients porteurs de mutations de *CECR1* présentent une absence d'élévation de l'eADA et un volume globulaire normal des érythrocytes. Les patients n'ont pas de malformations ni de retard de croissance.

J'ai reçu deux fois des échantillons de sang périphérique de l'un des patients français mais une seule différenciation érythroïde a fonctionné. Ce patient de sexe masculin est âgé à ce jour de 34 ans et fut diagnostiqué à l'âge de 7 ans. Il est actuellement en transfusion-sanguine dépendance. Le second patient français est un enfant en bas âge qui a été diagnostiqué en Août 2017. J'ai également reçu un duplicata de moelle osseuse pour 3 patients allemands dont j'ai réalisé l'extraction des cellules $CD34^+$ puis leurs mises en culture pour différenciation avec une étude en cytométrie en flux et la réalisation de culots cellulaires pour des analyses transcriptionnelles et protéiques jusqu'au quinzième jour de notre protocole. Pour des raisons de confidentialités, tous les résultats obtenus sur les patients allemands ne seront pas présentés dans ce manuscrit.

2. Etude de l'érythropoïèse dans les cellules primaires ex vivo du patient français ABD porteurs de variations alléliques du gènes *CECR1*

Le patient étudié a été prélevé à Strasbourg en hôpital de jour avant une transfusion sanguine devant être effectuée en urgence. A la réception de cet échantillon, j'ai réalisé une extraction des cellules $CD34^+$ puis une mise en culture de ces cellules. J'ai pu réaliser la différenciation érythroïde jusqu'au jour 15 de notre protocole de culture.

a. Nombre de cellules CD34$^+$

Le résultat de l'extraction des cellules primaires CD34$^+$ montrent une diminution du nombre de cellules CD34$^+$ chez le patient UPN#975 (1,56 x 10^4 cellules/ml) en comparaison du témoin sain (CTL : 2,076 x 10^4 cellules/ml) (figure 61). Il en était de même pour les résultats des moelles osseuses allemandes.

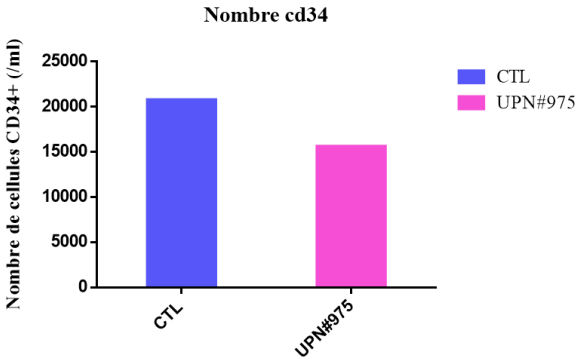


Figure 61: Diminution du nombre de cellules CD34$^+$ extraites à partir de sang total du patient ABD (UPN#975) et d'un témoin sain (CTL). Nombre de cellules CD34$^+$ extraites/ml après isolement des PBMCs chez le patient (UPN#975) et le témoin sain (CTL)

b. Etude de la prolifération des cellules CD34$^+$ mises en culture

La viabilité cellulaire est normale chez ce patient (figure 62A) et l'observation microscopique des cultures ne montrent pas une présence de débris anormale. L'étude de la prolifération cellulaire des CD34+ issues du patient porteur de variants de *CECR1* m'a permis de mettre en évidence une diminution de la croissance cellulaire qui commence au jour 5 de la culture et s'intensifie au dixième jour (figure). Les valeurs du nombre de cellules sont quasi-similaire au début de la différenciation (ln de 13.03 pour le patient et ln de 13.16 pour le contrôle). Au cinquième jour de différenciation, la prolifération du patient (ln de 12.032) diminue par rapport à celle du contrôle (ln de 12.719). L'écart ne cesse d'augmenter jusqu'au quinzième jour de la différenciation érythroïde (avec un ln de 19.38 pour le contrôle contre un ln de 17.48 pour le patient) (figure 62B). Malgré cette diminution, la présence de variants de *CECR1* n'entraîne pas le même défaut de prolifération des cellules érythroïdes que les autres nouveaux gènes identifiés.

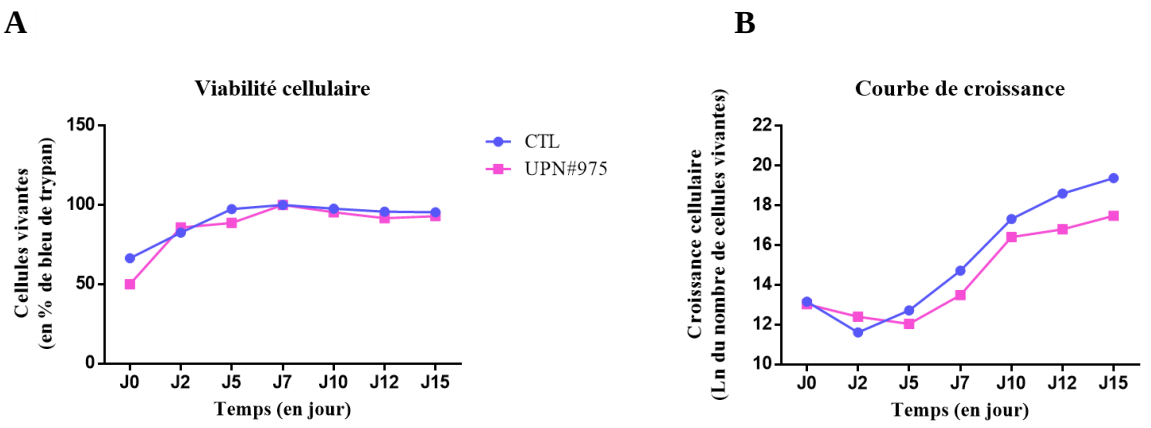


Figure 62 : Léger défaut de prolifération des cellules érythroïdes du patient porteur de variants *CECR1* et d'un témoin sain. (A) Viabilité cellulaire au cours de la différenciation érythroïde du patient (UPN#975) et du témoin sain (CTL). (B) courbe de croissance des cellules CD34+ en différenciation érythroïde *ex vivo*.

Il est intéressant d'observer qu'il en est de même pour le facteur d'amplification et le nombre de division cellulaire. Jusqu'à présent, le défaut de prolifération cellulaire était observable dès les premiers jours de la différenciation et tout au long de l'érythropoïèse. Les résultats de mon étude montrent une augmentation de l'amplification pour le patient d'un facteur 2 aux premiers jours de la différenciation (entre le jour 0 et le jour 2 le patient a un facteur d'amplification de 0.53 alors qu'il est de 0.21 pour le contrôle). Inversement, entre le deuxième jour et le septième jour, le facteur d'amplification du patient diminue (0.69 à J5 et 4.26 à J7) en comparaison de celui du contrôle (3.04 à J5 et 7.61 à J7). De façon surprenante, la tendance s'inverse entre les jours 7 et 10 pour ensuite reprendre la même tendance. Le nombre de division cellulaire suit les mêmes variations (figure 63A). Le nombre de division cellulaire chez le patient est supérieur entre le jour de la mise en culture et le deuxième jour (-0.91 contre -2.24) puis va être inférieur au contrôle jusqu'au dixième jours où le nombre de division du patient va subir une forte augmentation (passant de 2.09 à 4.23 pour le patient contre 2.93 à 3.70 pour le contrôle) (figure63B). L'ensemble de ces résultats ont été observés de manière similaire chez les patients allemands.

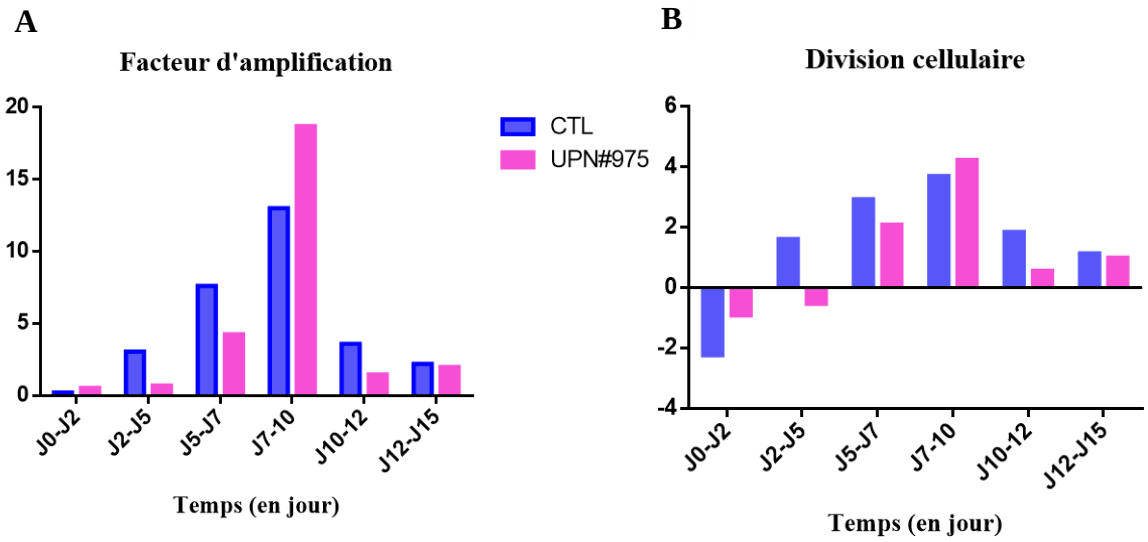


Figure 63: Défaut d'amplification et de division cellulaire des cellules CD34+issues de sang périphérique du patient porteur de variants CECR1 et d'un témoin sain. (A) Facteur d'amplification des cellules érythroïdes. (B) Nombre de division cellulaire des cellules érythroïdes.

Les variations alléliques présentes sur le gène *CECR1* semblent induire un défaut de l'érythropoïèse. Cependant, bien qu'une anomalie cellulaire soit observable entre les stades BFU-e et CFU-e, une réponse semble être apportée afin de la combler au cours des stades plus avancés de la différenciation.

a. Etude des marqueurs de surface au cours de la différenciation érythroïde

J'ai réalisé des analyses de cytométrie en flux sur des cellules érythroïdes issues de $CD34^+$ en culture afin d'étudier la présence ou non de différents marqueurs de l'érythropoïèse. Je me suis intéressée aux marqueurs d'immaturité de la différenciation érythroïde.

Mes résultats montrent que le marqueur d'immaturité CD34 n'est pas présent chez le patient ABD tout comme le témoin sain (UNP#975 : 1.83% contre 0.83% pour contrôle) (figure 64A). En revanche, nous observons une persistance du marqueur d'immaturité IL-3R chez le patient (UPN#975 : 32.21% contre 9.97% chez le témoin) tout comme un léger retard dans l'apparition du marqueur de différenciation CD36 (UPN#975 : 84.06% contre 94.4% chez le

témoin) (figure 64B). Ces résultats étaient retrouvés chez les moelles de patients ABD allemandes étudiées.

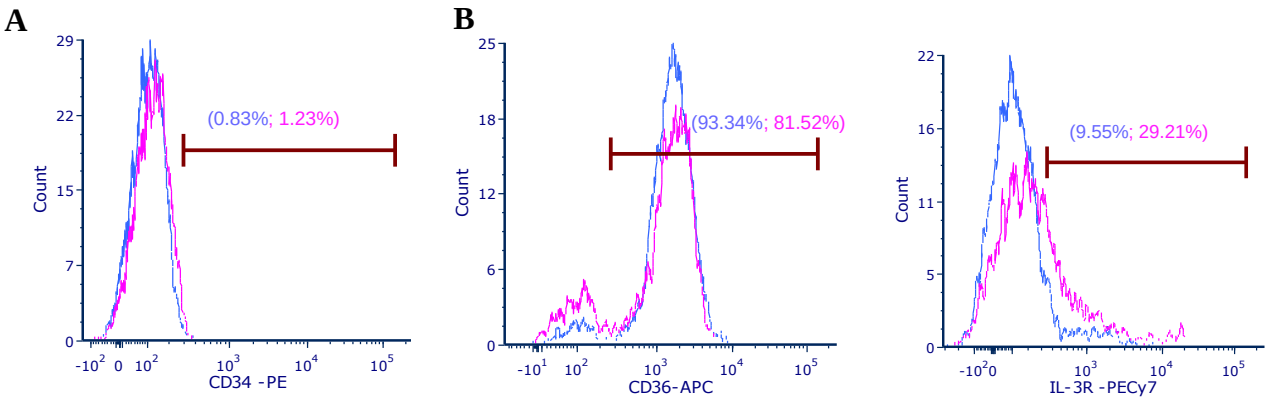


Figure 64: Persistance du marqueur d'immaturité IL-3R et retard d'apparition du marqueur de différenciation CD36 à la surface des cellules érythroïdes issues des CD34$^+$ au cours de la différenciation érythroïde chez le patient ABD porteur de variants CECR1. (A) Histogramme du marqueur CD34 (B) Histogramme des marqueurs CD36 et IL-3R. En rose : patient ABD (UPN#975) porteur de variants CECR1 ; en bleu : témoin sain (CTL)

En conclusion, mes résultats permettent de montrer un retard dans la disparition du marqueur d'immaturité IL3-R chez les patients porteurs de variant CECR1. En parallèle, l'apparition du marqueur de différenciation CD36 présente un léger retard pour la condition pathologique ce qui n'est pas le cas du marqueur d'immaturité CD34. Ces résultats bien que précoces mériterait d'être approfondi et élargie à tous les patients génotypés avec des variants de ce gène afin de valider nos conclusions.

DISCUSSION

Chapitre 8 : Discussion

Après la caractérisation de certains des mécanismes physiopathologiques responsables du tropisme érythroïde et la survenue de la maladie (Moniz et al., 2012 ; Gastou et al., 2017 ; Rio et al., 2019), notre groupe s'est intéressé à une approche gène candidat pour les cas d'Anémie de Blackfan-Diamond qui au terme d'un screening moléculaire extensif restent sans génotype. Au cours de cette thèse, nous avons mis en évidence l'implication de nouveaux gènes dans le développement de l'anémie de Blackfan-Diamond : *RPL9, HSPA14, HEATR3* et *CECR1*. Certains d'entre eux comme *RPL9* sont impliqués dans la survenue de cancer selon le type de variation allélique. De façon intéressante, les gènes *HSPA14* et *HEATR3* sont des protéines chaperons dont la première appartient à la famille des HSP70 et la seconde à la famille des chaperons du ribosome ou de RP.

Notre étude réalisée sur 25 trios de la cohorte des 20% de patients atteint d'ABD ne possédant pas de génotype caractérisé nous a permis de valider l'implication d'un nouveau gène « classique » de l'ABD puisqu'il s'agit d'un gène de RP (*RPL9*) mais également d'un nouveau groupe de gènes, codant pour des protéines chaperons. En ce sens, ces résultats sont très innovants puisque c'est la première fois que d'autres composants du ribosome et en particulier des chaperons se trouvent impliqués dans l'ABD. De plus, bien que nous ayons démontré que l'expression de la protéine HSP70 était considérablement réduite dans les cellules érythroïdes issues de patients atteints d'ABD présentant une mutation hétérozygote d'une protéine RP, c'est la première fois qu'une mutation dans l'un des membres de la famille HSP70 soit retrouvé impliqué dans l'ABD.

Nous avons effectué des séquençages d'exomes (LABEX-GR-Ex, plateforme Imagine, Necker, Paris) sur 25 trios (propositus + 2 parents) de familles nous permettant d'identifier deux gènes codant pour deux protéines appartenant à des familles dont le rôle est de chaperonner d'autres protéines soit en les protégeant contre le repliement ou l'agrégation soit en les transportant jusqu'à leur site d'activité. Les études de l'érythropoïèse réalisées via des cultures cellulaires primaires érythroïdes obtenues à partir de cellules $CD34^+$ issues de sang périphérique des patients ABD nous a permis d'observer un défaut majeur (bien plus important que pour les gènes de RP) de prolifération, de viabilité cellulaire et, un retard de différenciation érythroïde chez les patients atteints d'ABD porteurs de ces variations. Le retard de différenciation érythroïde semble objectivé sur la persistance des marqueurs d'immaturité CD34 et IL3-R ainsi

qu'un retard d'apparition des marqueurs de la différenciation érythroïde terminale tels que les marqueurs CD36, BAND3, alpha4-intégrine ou GPA. La diminution importante de la prolifération érythroïde semble résulter plus d'une activation de l'apoptose que d'un arrêt du cycle cellulaire, objectivé par le nombre de cellules en phase subG1 dans les cellules érythroïdes issue du patient porteur de la variation allélique de *HSPA14* (cycle cellulaire non encore étudié pour *HEATR3*). Les résultats ne sont pas encore finalisés dans leur totalité pour ce gène mais sont d'ores et déjà très prometteurs. Des analyses de l'expression protéique et transcriptionnelle de la protéine d'intérêt, p53, protéine cellulaire clé, ainsi que de ses voies cibles sont nécessaires pour finaliser notre étude. De façon surprenante, nos résultats chez le patient porteur de variants *HEATR3* amènent de nouvelles hypothèses sur la cause du défaut de prolifération des cellules érythroïdes. En effet, l'étude protéique réalisée sur les expressions de la procaspase-3, de PARP et de Bcl-xL dans la lignée lymphoblastoïde issue du patient porteur des variations de *HEATR3* semble mettre en évidence une augmentation de celles-ci. L'observation d'une suractivation de la protéine PARP peut mener à penser qu'une un mort cellulaire par nécrose est responsable du défaut de l'érythropoïèse. Cependant, une augmentation de l'expression transcriptionnelle de *bax* et de l'expression transcriptionnelle et protéique de la p21 dans la lignée lymphoblastoïde issue du patient porteur des variations de *HEATR3* peuvent aussi suggérer une activation de la voie apoptotique. Des expériences supplémentaires semblent nécessaires avant d'affirmer l'implication d'une des deux voies de mort cellulaires.

Parallèlement à l'étude de cette nouvelle catégorie de protéines pouvant être liée à l'apparition et au développement de la maladie, des analyses exomiques ont permis de mettre en évidence qu'un gène codant pour une protéine ribosomique (*RPL9*) peut non seulement être responsable de l'ABD mais également être associé au développement d'un cancer en fonction des variants de ce gène.

Le gène *RPL9* avait été précédemment décrit comme un gène seulement putatif de l'ABD dans la mesure où le variant identifié, n'était pas responsable d'un défaut de maturation des ARNr (Gazda et al., 2008)(Doherty et al., 2010). Nous montrons dans notre étude que *RPL9* doit être considéré désormais comme un gène de l'ABD dans la mesure où la variation allélique de la 5'UTR c.-2+1 ; p.? est accompagnée non seulement d'un défaut de l'érythropoïèse caractéristique de l'ABD : défaut drastique de la prolifération, retard de différenciation érythroïde, stabilisation de la p53 et activation de l'apoptose (Nombre de cellules $DAPI^{neg}$/annexine V^{+} augmenté) mais aussi d'un défaut de maturation des ARNr : diminution

des ratios, 12S/32S et 21S/30S et des monosomes des sous-unités 60S et 80S sur les profils de polysomes. Outre cette validation de *RPL9* comme gène ABD, nous avons pu montrer avec nos collaborateurs qu'un autre variant de la RPL9, p.Leu20Pro identifié chez un patient hollandais n'était pas pour le coup associé à un phénotype érythroïde de l'ABD (absence d'anémie, ni autre signe d'un possible phénotype silencieux) mais à un risque de cancer. Au cours de cette étude, les différents variants mis en évidence présentent des anomalies similaires dans la maturation des pré-ARNr mais possèdent des impacts différents en aval de cette anomalie initiale de la biogenèse des ribosomes. Les résultats suggèrent un modèle selon lequel les cellules porteuses d'un variant de protéine ribosomique liée à l'ABD génère moins de sous-unités ribosomique 60S, réduit la glycolyse, passe à la gluconéogenèse et catabolisent les acides aminés comme source de carbone. Bien que les effets en aval du pré-ARNr semblent similaire, seul le variant 5'UTR de *RPL9* présente une stabilisation de p53 accompagnée d'une apoptose ainsi qu'un défaut de prolifération et de différenciation érythroïde. Inversement, le variant p.Leu20Pro, associé à un risque de malignité, a peu d'effet sur l'érythropoïèse, résultats conformes au phénotype des patients porteurs de ce variant qui ne présentent ni un phénotype d'insuffisance médullaire ou une anémie. De plus, l'incorporation du variant RPL9 p.Leu20Pro au sein des sous-unités ribosomiques 60S compromet la fidélité de la traduction du ribosome. Une augmentation à la fois de lecture des codons stop et de la synthèse des ribosomes est observée. Ces deux actions empêchent le ralentissement de la prolifération cellulaire qui pourrait être à l'origine des cancers. Toutes les données obtenues suggèrent qu'en dépit de défauts similaires de maturation du pré-ARNr dans les cellules porteuses des différents variants d'un même gène RP, les effets en aval peuvent diverger considérablement.

Secondairement, le gène *RPL13* a été montré comme impliqué dans un phénotype musculosquelettique (dysplasie osseuse) chez un patient qui ne présentait pas d'anémie associée donc sans ABD, ni autre signe d'un phénotype silencieux ABD mais avec néanmoins, un discret défaut de l'érythropoïèse *in vitro*. Il s'agit d'un nouvel exemple d'une haploinsuffisance en une RP pouvant être responsable d'un phénotype d'origine constitutionnelle autre que l'ABD. Une nouvelle ribosomopathie est ainsi nouvellement décrite.

Ainsi, plusieurs variants *de novo* du gène *RPL13* ont été identifiés chez 4 patients non apparentés atteints d'une dysplasie osseuse sévère mais ne présentant aucun symptôme ni anomalie hématologique au sein de leur numération cellulaire. Cependant, de façon étonnante, nous avons trouvé une atteinte discrète et tardive de l'érythropoïèse chez un des patients

porteurs d'un variant de *RPL13*. En effet, une diminution du nombre de cellules au cours de la différenciation érythroïde terminale a été mise en évidence sans atteintes aux stades précédents. De plus, nous avons observé que la viabilité des cellules érythroïdes n'est pas impactée bien que l'amplification cellulaire soit réduite au stade terminal de l'érythropoïèse. Notre analyse de la différenciation érythroïde en CMF montre aucune anomalie dans l'apparition des différents marqueurs de différenciation. De façon également très étonnante, bien que la maturation du pré-ARNr ne semble pas être affectée dans les cellules lymphoblastoïdes des patients, le knowck-down par siRNA spécifiques de *RPL13* réalisé dans des cellules HeLa induit une atteinte de la maturation de l'ARNr associée à une augmentation des fragments 45S et 41S. Les protéines synthétisées à partir des variants du gène *RPL13* s'incorporent dans le ribosome comme les protéines de type sauvages.

Les variants *de novo* du gène *RPL13* décrits induisent une nouvelle forme de dysplasie osseuse sévère. C'est la première fois que le gène *RPL13* est impliqué dans une ribosomopathie humaine affectant spécifiquement le tissu osseux.

Pris ensemble, ces résultats soulignent l'élargissement du paysage des phénotypes cellulaires et cliniques associés aux variants génétiques de protéines ribosomiques humaines. La découverte d'un nouveau groupe de gènes candidats liés à l'anémie de Blackfan-Diamond ajoute une nouvelle complexité à la définition clinique et biologique de la maladie bien que ces gènes codent pour des protéines chaperons des ribosomes avec un retentissement fonctionnel sur la maturation des ARNr (signature fonctionnelle de l'ABD).

Les données obtenues au cours des différents travaux montrent que les cellules érythroïdes de patients ne possèdent pas le même destin en fonction des mutations d'un gène RP (exemple de *RPL9* et *RPL13*). Les résultats de ces travaux ouvrent d'un côté une nouvelle porte pour les futurs potentiels gènes candidats liées à l'ADB et d'un autre côté de nouvelles perspectives d'implications des protéines ribosomiques dans des maladies humaines.

I. Des variants de protéines ribosomiques induisant soit l'anémie de Blackfan-Diamond soit un processus malin (variants du gène *RPL9*) ou une nouvelle ribosomopathie constitutionnelle (variants du gène *RPL13*).

Les mutations dans des gènes codant pour une protéine ribosomique ou un cofacteur de la biogenèse du ribosome sont liées à une classe de maladies appelées ribosomopathies. Elles peuvent être congénitales ou acquises. L'ABD est certes la première ribosomopathie constitutionnelle décrite en 2005 (Léger-Silvestre et al., 2005) mais depuis d'autres ribosomopathies d'origine constitutionnelle ont été décrites. Elles sont pour certaines également associées à une insuffisance médullaire mais avec des spécificités autres que l'ABD telles que la dyskératose congénitale par mutation de la dyskérine (gène *DKC1*), le syndrome de Shwachman (gène *SBDS*), ou le syndrome cartilage hair hypoplasia (gène *RnaseMRP*). Par ailleurs, un nombre croissant de gènes de RP porteurs de variants héréditaires ou sporadiques ont été découverts dans des pathologies ne présentant pas d'insuffisance médullaire. En effet, des variants de *RPS23* (Paolini et al., 2017) ou *RPL10* ont été identifiés chez des patients atteints d'autisme ou de déficience intellectuelle associé à un dysmorphisme (Bourque et al., 2018; Paolini et al., 2017; Zanni et al., 2015). Des variations du gène *RPSA* sont responsables d'une asplénie congénitale (Bolze et al., 2013; Griffin et al., 2018). En collaboration avec différentes équipes françaises et internationales, et à travers l'étude des deux protéines ribosomiques, RPL9 et RPL13, notre équipe a montré que selon le gène, une haploinsuffisance en un gène de RP pouvait être associé à une érythroblastopénie (RPL9) ou non (RPL13) et qu'au sein d'un même gène de RP (*RPL9*), le type de variations alléliques était responsable dans un cas, d'une ABD authentique et dans l'autre famille étudiée, d'une susceptibilité au cancer. L'haploinsuffisance en RPL13 est par ailleurs un nouvel exemple de ribosomopathie constitutionnelle non responsable d'ABD ou autre insuffisance médullaire. Une haploinsuffisance en une RP peut donc induire différentes ribosomopathies avec différentes conséquences pathologiques selon la RP et au sein d'un même gène de RP, certains variants alléliques plus que d'autres semblent donner un avantage prolifératif pouvant conduire au développement de cancers.

Les RP sont impliquées dans la cancérogenèse avec pour exemple *RPS14* responsable du syndrome myélodysplasique 5q- (Ebert et al., 2008) et le rôle récent démontré de RPL10, RPL5 (De Keersmaecker et al., 2013) et RPS27a (Houcai Wang et al., 2014) dans certaines hémopathies, leucémie aiguë lymphoblastique T (RPL5) et la leucémie aiguë myéloïde et la leucémie chronique myéloïde (RPS27a) respectivement. Ces deux gènes sont retrouvés mutés

au cours de l'ABD. On pourrait suggérer que comme RPL9, certaines mutations de ces gènes sont susceptibles d'entraîner une ABD ou une hémopathie selon le type de variant. Il est souvent difficile de savoir si les variations alléliques identifiées au cours d'une hémopathie sont germinales ou somatiques quand les gènes sont également responsables d'une maladie rare avec prédisposition au cancer.

Par ailleurs, des variants somatiques des gènes de RP ont également été retrouvés dans plusieurs exomes de patients atteint d'un cancer solide, telle que dans le mélanome ou le cancer du sein (RPL5), le cancer colorectal ou endométrial (RPL22) (De Keersmaecker et al., 2013; Fancello et al., 2017; Ferreira et al., 2014; Landau et al., 2015).

De même, les RP sont également connues pour être impliquées dans d'autres processus de la cancérogenèse telles que la réparation de l'ADN (RPS3, P0, P1, 2) (J. Kim et al., 1995), l'apoptose (RPS3a (Z. B. Hu, Minden, & McCulloch, 2000), RPS6 (Volarević et al., 2000), RPS14 (Ebert et al., 2008), RPL5, RPL7 (Neumann & Krawinkel, 1997), RPS29 (Khanna et al., 2000) et la prolifération cellulaire (RPS3a, RPS6, RPS8, RPS12, RPL5, RPS9 (Kondoh et al., 1992), RPL4 (Chatterjee et al., 2006), RPL7 et RPL15 (Wang et al., 2006)). Le lien entre RP et cancérogenèse est donc bien établi. L'élément nouveau que ce travail européen collaboratif apporte est la démonstration que selon le type de variant au sein d'un même gène, la conséquence de ce variant sera soit une ABD soit un processus malin.

L'ensemble des résultats portant sur l'étude des variants de *RPL9* nous permet de suggérer que l'un des variants, celui situé dans la 5'UTR, qui est similaire à tous les autres gènes de RP rapportés jusqu'à ce jour comme étant lié à l'ABD induit une haploinsuffisance de la protéine RPL9. A l'inverse, étant incorporée au sein des ribosomes matures et modifiant l'interprétation de certains codons stop, le variant p.Leu20Pro pourrait être dépeint comme un processus « gain de fonction ». Malheureusement, en absence d'un modèle murin, il est difficile d'affirmer avec certitude le lien entre ce variant et le développement de cancers observés chez les patients. Cependant, les données de la littérature établissant un lien entre des mutations de gènes de RP et le développement de cancer ainsi que l'absence d'autre mutation lors des analyses génétiques nous permettent d'émettre la forte possibilité d'un tel lien. Avec un risque de malignité élevée au cours de l'ABD de 4. 8% pour le risque de tout cancer (Observed/Expected ratio) à 13.7% pour l'incidence cumulative des tumeurs solides et hémopathies à 45 ans de vie dans la dernière étude américaine (Adrianna Vlachos et al., 2018), il semble donc important de redoubler de vigilance quant à la survenue possible de cancer au

cours de l'ABD ce d'autant que l'amélioration des diagnostiques, de la prise en charge et des traitements, notamment les chélateurs en fer, augmentent la durée de vie des patients : un myélogramme et des coloscopies régulières pourraient être préconisées à partir de 35-40 ans. De plus, des mutations activatrices du gènes *TP53* ont été récemment rapportées au cours de l'ABD (Toki et al., 2018). Le gène suppresseur de tumeur p53 est retrouvé muté dans approximativement 50% des cancers. Malgré ces avancées, les mécanismes qui concourent à la survenue de malignité au cours de l'ABD restent à ce jour mal élucidés. Une fidélité de la traduction altérée comme dans le cas présenté dans l'étude collaborative européenne pourrait être un des mécanismes responsables.

Bien que des anomalies squelettiques ont été rapportées dans des ribosomopathies telles que l'ABD ou le syndrome de Treacher Collins, aucune de ces maladies ne peut être considérée comme une dysplasie squelettique. Les ribosomopathies touchant un tissu ou un organe sont également très rares. Pour exemple, « la cartilage hair hypoplasia » est une chondrodysplasie métaphysaire causée par des variants pathogènes de RMRP (pour RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease) (Mattijssen et al., 2011). L'ARN de RMRP est associé à plusieurs sous-unités protéiques et forme une particule ribonucléoprotéique nucléaire, la RNase MRP (Gill et al., 2004). RMRP est un facteur clé pour la régulation des chondrocytes hypertrophiques et le knock-down de ce facteur induit un défaut de différenciation de ces cellules (Steinbusch et al., 2017). Dans l'étude à laquelle nous avons été associées et qui a porté sur quatre patients atteints d'une dysplasie osseuse sans anomalies hématologiques, nous nous sommes intéressées pour notre participation aux effets sur l'érythropoïèse d'une haploinsuffisance en la protéine ribosomique, RPL13. Les patients ne présentent aucun symptôme comme l'anémie, l'insuffisance médullaire ou les anomalies faciales ou du crâne comme observé dans l'ABD ou d'autres ribosomopathies (hypoplasie du cartilage, syndrome de Treacher Collins) (P. A. Trainor & Merrill, 2014). Tout comme la RNase MRP, les résultats obtenus par l'équipe nantaise suggèrent que la protéine RPL13 est exprimée au sein de la plaque de croissance et des cellules qui tapissent le trabéculum osseux primaire. Cette localisation pourrait être dûe au rôle de la protéine dans les chondrocytes et/ou les ostéoblastes de la plaque de croissance. Toutes les données obtenues au cours de l'étude réalisée confirment que les divers variants de RPL13 provoquent une dysplasie squelettique rare et une petite taille. L'intégrité de RPL13 est donc essentielle au développement des plaques de croissance. Cette nouvelle ribosomopathie pourrait affecter le développement osseux en diminuant le niveau de

traduction dans les cellules de la plaque de croissance comme le suggère les résultats obtenus sur la lignée érythroïde. Il semble nécessaire de pousser les études sur cette nouvelle protéine identifiée comme pouvant être responsable d'une ribosomopathie afin d'élucider les impactes spécifiques de chaque variant de *RPL13* sur la traduction des différents facteurs de la plaque de croissance. La protéine RPL13 possède un rôle essentiel dans l'assemblage ribosomique puisqu'en son absence, un arrêt de la maturation à un stade précoce de l'assemblage ribosomique a été visualisé (Kater et al., 2017). A ce jour, les mécanismes physiopathologiques liés à des mutations dans des gènes exprimés de façon ubiquitaire mais induisant un phénotype tissu-spécifique n'est pas élucidée à l'exception en partie de l'ABD.

Ainsi, il semble que les variants des RP qui altèrent la biogenèse des ribosomes n'entraînent pas universellement une anémie et une ABD et que les phénotypes cliniques liés à ces variants dépendent d'un ensemble plus complexe d'événements. Cependant, un discret défaut de l'érythropoïèse tardive a pu être mis en évidence au moins *in vitro* à partir des cellules $CD34^+$ périphériques issues d'un des patients et la question d'un phénotype particulier de l'ABD pourrait se discuter également avec encore une fois la démonstration de la pénétrance incomplète de l'ABD.

II. Des gènes codant pour des protéines chaperons identifiées comme responsables de l'anémie de Blackfan-Diamond

De plus en plus de mutations dans des gènes affectant des gènes non ribosomiques sont identifiées chez des patients atteints d'ABD. A ce jour, tous ces gènes possèdent un lien plus ou moins important avec l'érythropoïèse (*GATA-1*, facteur de transcription indispensable de l'érythropoïèse ; *EPO*, cytokine indispensable de l'érythropoïèse tardive) ou la maturation des ARNr (*TSR2*, également partenaire de RPS26). L'identification de protéines chaperons est une nouvelle catégorie de gènes que nous montrons dans cette thèse comme pouvant être liée à la maladie.

Nous avons pu ainsi identifier les gènes de *HSP14* (1 famille) et *HEATR3* (3 familles, une en Hollande, une en France et une en Turquie), deux gènes codant pour deux protéines chaperons.

HSPA14 joue un rôle au cours de la traduction en empêchant l'agrégation des protéines via son association au complexe RAC. Une équipe collaboratrice de Toulouse (Dr MF. O'Donohue, Pr PE. Gleizes, LBME, Université Paul Sabatier, Toulouse) a mis en évidence une altération de la maturation des ARNr ce qui suggère un défaut d'assemblage du ribosome lié à une haploinsuffisance en HSPA14. En outre, la protéine HSPA14 possède également un rôle dans la maturation des MoDC via un mécanisme d'autorégulation aux différents stades de différenciation. Dans cette optique, nous avons étudié la différenciation érythroïde chez le patient atteint d'ABD possédant un variant *HSPA14*. Un important défaut de viabilité est observé et est objectivé par une augmentation des cellules en phase SubG1 ce qui semble traduire une apoptose plus importante des cellules. Il est nécessaire de finaliser les analyses d'expression transcriptionnelles et protéiques de HSPA14, de la protéine p53 ainsi que les différentes voies qu'elle régule. Néanmoins, nous avons pu mettre en évidence une diminution de prolifération et de différenciation érythroïdes. L'analyse des marqueurs de différenciation en CMF a montré une persistance des marqueurs d'immaturité CD34 et IL3R à un stade où normalement ils ne sont plus présents et un retard d'apparition du marqueur de différenciation BAND3. L'apparition d'une population doublement négative pour les marqueurs CD34 et CD36 laisse également penser que les cellules différenciées sont moins matures que ce qu'elles devraient être à ce stade de la différenciation. La perte du marqueur CD34 et l'absence du marqueur CD36 pourrait causer leur arrêt de prolifération et de différenciation entraînant ainsi une mort cellulaire.

Bien que les données de nos collaborateurs de Toulouse sur ce projet, aient déjà permis de valider l'effet pathogène des divers variants identifiés par 1) la reproduction du défaut de la maturation de l'ARNr par des siRNA spécifiques des gènes cibles (Dr MF. O'Donohue, Pr PE. Gleizes, LBME, Université Paul Sabatier, Toulouse) 2) l'utilisation d'un modèle de poisson zèbre et l'invalidation des gènes cibles par des Cripsr/cas9 (Aurore Anton, Pascale Dufourcq, P. Blader, Université Paul Sabatier Toulouse), il semble nécessaire de poursuivre cette étude en invalidant chacun de ces gènes au sein de cellules érythroïdes humaines. Pour cela, nous (Adeline Mayeux et moi-même) avons mis au point différents shARN (2-3) pour chacun des gènes (constructions moléculaires terminées mais lentivirus non encore produits). Des constructions de Crispr/Cas9 de HSPA14 sont en cours de production également. L'infection de cellules érythroïdes primaires humaines par ses shARN ou Crispr/Cas9 permettrait d'appuyer davantage nos hypothèses et les résultats obtenus jusqu'à ce jour. L'emploi de shARN permettrait également de valider l'effet de la mutation à la fois sur la prolifération et la

différenciation érythroïde mais également sur les différentes voies régulées par la protéine p53 telle que l'apoptose et le cycle cellulaire et les voies spécifiques de chacun des gènes (HSPA14 et le complexe RAC). Une réversion phénotypique par un lentivirus reproduisant l'ADNc sauvage de la protéine validerait définitivement l'implication de ces nouveaux gènes dans la survenue de la maladie. Ces expériences permettraient également de contrer le manque de cellules primaires issues de ces patients dont les cellules érythroïdes prolifèrent tout particulièrement mal et les difficultés engendrées à réaliser les expériences dans leur globalité (30ml de sang permettent d'étudier un point de CMF pour le patient porteur de la variation *HSPA14*) ou de les répéter.

L'identification du variant *HEATR3*, une protéine chaperon ayant un rôle dans l'import de deux RP, RPL11 et RPL5, met en évidence la forte probabilité du rôle de ce variant dans l'apparition de la maladie. Le chaperon HEATR3 possède un double rôle dans la synthèse des ribosomes en régulant l'association de RPL5 et RPL11 à la sous unité pré-60S et en agissant sur l'assemblage de la 5S RNP. L'étude de l'érythropoïèse *ex vivo* des cellules de patients montre une faible viabilité cellulaire accompagnée d'une forte diminution de la prolifération et de la différenciation ainsi que d'un défaut de division cellulaire. L'analyse des marqueurs de différenciation en CMF appuie l'argument d'un défaut de différenciation avec la persistance des marqueurs d'immaturité. De plus, les premiers résultats obtenus sur des cellules lymphoblastoïdes issues du patient semblent montrer une implication des voies de mort cellulaire par notamment une stabilisation de la protéine clé de cette machinerie cellulaire, p53, l'augmentation de l'activité transcriptionnelle et protéique de p21 et celle de l'activité transcriptionnelle de bax. L'augmentation protéique de PARP nécessite également d'approfondir nos recherches sur les différentes voies de mort cellulaire. Une étude de l'activation des caspases par cytométrie en flux via des marqueurs communs à toutes les caspases (VAD) ou spécifiques au site de coupure de certaines caspases (IEDV) couplée à une étude protéique de la caspase 3 clivé permettrait de valider l'activation de la voie apoptotique. Parallèle à cette étude, une étude au marquage par l'annexin-V couplée à de l'iodure de propidium permettrait également d'observe l'état apoptotique ou nécrotique des cellules érythroïdes.

L'établissement de lignées lymphoblastoïdes est un réel avantage dans l'étude de la mutation chez les patients atteint d'ABD ; elle permet d'effectuer des expériences avec des quantités de cellules bien plus grandes que les cellules primaires érythroïdes de patients, de réaliser, pour nos collaborateurs, les Northern blot et études des polysomes (envoi de cellules

congelées ou fraîches). Malheureusement, certaines cellules de patients ne répondent pas à l'infection et l'immortalisation ne peut être réalisée. L'autre écueil consiste en l'origine cellulaire de la lignée : origine lymphocytaire qui diffère de la lignée érythroïde et du tropisme pour cette lignée, de l'ABD. L'HSP70 (HSP70A/B) a été retrouvé normalement exprimée dans les lignées lymphoblastoïdes immortalisées des patients ABD pour lesquels elle est retrouvée absente dans les cellules érythroïdes en différenciation chez les patients mutés *RPL5, RPL11 et RPS19* (Gastou et al., 2017). Du fait de nos résultats surprenant sur l'augmentation de l'expression protéique de HSP70 dans la lignée lymphoblastoïde issue de la famille du patient porteur de variants *HEATR3*, il serait intéressant d'étudier d'autres protéines chaperons telles que HSP90 ou HSP60 afin de confirmer nos données. Il est possible qu'en réponse à la mutation qui provoquerait des agrégations protéiques ou induirait des repliements anomaux aux protéines néosynthèses, les cellules surexpriment le chaperon HSP70 pour assurer la viabilité des cellules. Les résultats obtenus dans cette lignée devront être validés dans les cellules de patients en différenciation érythroïde et dans le modèle shARN ou Crispr/Cas9. Seule la réversion phénotypique avec un lentivirus sauvage exprimant la protéine sauvage permettra de confirmer le rôle de ces deux chaperons dans la physiopathologie des deux familles étudiées.

Grâce aux avancées technologiques dans le domaine de la génétique et à l'étude au cas par cas des patients sans génotype à ce jour, on peut espérer que les 20% des patients atteints d'ABD sans diagnostic génétique après des techniques NGS/CGH auront un génotype clairement identifié dans les années à venir. Cependant, la caractérisation fonctionnelle d'un gène identifié et la validation certaine de son rôle dans la survenue de l'ABD est très consommateur de temps pour un gène donné. Pour exemple, nous avons identifié 8 gènes à exploiter comme étant potentiellement candidats pour l'ABD. Les études fonctionnelles et la validation du gène candidat sont finalisées pour seulement deux d'entre eux (*RPL9* et *HEATR3*), deux autres sont en cours d'étude (*HSPA14* ; *CECR1*) et quatre autres ont simplement été initié (extraction des cellules primaires $CD34^+$ et mise en culture avec une étude de la différenciation érythroïde). C'est aussi rappeler la nécessité, pour aboutir rapidement à une confirmation fonctionnelle de l'implication d'un gène dans l'ABD, de la mise en place de collaborations internationales d'équipes médicales et scientifiques aux spécificités différentes (étude des ribosomes (Pr PE. Gleizes, Toulouse), génération de modèles animaux (poissons zèbres, P. Blader, Toulouse) et accès à d'autres patients porteurs de mutations dans le même gène (consortium EURODBA)).

III. Un nouveau gène identifié chez des patients ayant une érythroblastopénie (mode d'entrée dans l'observatoire des patients Français atteints d'ABD-OFABD) non responsable d'une ribosomopathie.

L'ABD fait partie des syndromes d'insuffisances médullaires avec la particularité d'être la première ribosomopathie décrite. Cependant, au cours de nos recherches exomiques, nous avons identifié un nouveau gène comme lié à l'ABD chez deux patients français de l'observatoire des patients ABD. Grâce à nos différentes collaborations européennes et au consortium international existant (EURODBA), nous avons pu confirmer la présence de variants au sein du gène *CECR1* codant pour l'adénosine désaminase 2 chez plusieurs patients. La transmission est autosomale récessive. Une variation allélique homozygote ou deux variations hétérozygotes composites sont responsables d'un déficit en ADA2 (DADA2). Il s'agit d'une maladie rare dont les patients présentent des symptômes affectant différents systèmes tels que le système vasculaire, immunitaire (P. Y. Lee, 2018) ou encore le système musculaire avec des atteintes musculosquelettiques (myalgie, myosite, arthrite) (Meyts & Aksentijevich, 2018; Sahin et al., 2019). Des anomalies hématologiques ont également été observées dont les complications se présentent par une diminution du nombre de leucocytes, de plaquettes et des érythrocytes (pancytopénie) mais peuvent donner lieu seulement à une hypoplasie pure des globules rouges (érythroblastopénie) semblable à l'anémie de Blackfan-Diamond (Sasa et al., 2015 Adenosine deaminase 2 deficiency as a cause of pure red cell aplasia mimicking diamond blackfan anemia). Bien que sa place dans la liste des gènes liés à l'ABD soit discutée, les patients porteurs de variant de *CECR1* partagent certains aspects phénotypiques des autres patients atteints d'ABD et notamment l'érythroblastopénie. C'est pourquoi, les registres internationaux d'ABD identifient actuellement des patients ayant un déficit en ADA2. L'étude de l'érythropoïèse a permis de mettre en évidence que bien que la viabilité cellulaire soit plus importante que pour les autres mutations nouvellement identifiées, les patients présentant des variants de *CECR1* montrent une diminution de la prolifération et de la différenciation érythroïde. L'analyse des marqueurs cellulaires de différenciation montre une persistance du récepteur à l'IL3 accompagnée d'un léger retard d'apparition du marqueur CD36. En vue du nombre croissant de patients présentant des variants de *CECR1*, il serait intéressant de poursuivre les études sur ce gène. De plus, il semble que la mutation apparaisse chez les patients originaires de la même région du monde et notamment la Turquie et le Maghreb, à tel point que dans le registre Turque, *CECR1* est le second gène screené après *RPS19* en cas d'érythroblastopénie.

Cependant, l'absence de ribosomopathie chez les patients porteurs de mutations de *CECR1* (maturation des ARNr normale), l'absence d'élévation de l'eADA, un volume globulaire moyen normal des érythrocytes mais malgré tout une érythroblastopénie d'allure congénitale et un certain degré de corticosensibilité discutent la définition de l'ABD. Pour certains, compte tenu d'un phénotype très particulier du déficit en ADA2 et bien caractérisé depuis longtemps, les patients porteurs de mutation de CECR1 devraient sortir des registres ABD quand pour d'autres, ils doivent rester dans le cadre plus large des syndromes d'ABD avec une érythroblastopénie congénitale sans anomalie de maturation des ARNr. La question n'est à ce jour pas tranchée dans la communauté médicale et scientifique de l'ABD. Ce pourquoi nous l'avons discuté à part dans ce travail de Thèse.

Au total, nous avons identifié grâce à des travaux collaboratifs 8 gènes candidats. Nous avons pu finaliser et valider 2 nouveaux gènes, deux autres sont en fin d'étude et les quatre autres sont en cours d'étude. Ils sont impliqués dans l'ABD qui rentrent dans le cadre de l'ABD classique avec atteinte de la maturation des ARNr (ribosomopathie) mais qui questionnent sur le rôle physiopathologique des différents gènes de RP (défaut spécifique de l'érythropoïèse versus atteinte spécifique d'un autre tissu) et au sein d'un même gène de RP, sur l'effet pathogène des différents variants incriminés (variant responsable d'ABD versus variant impliqué en cancérogenèse).

Par ailleurs, depuis plusieurs années, la définition de l'ABD, ses caractéristiques cliniques et biologiques permettant son diagnostic sont constamment remises en question avec les avancées de la recherche en évolution constante. Une meilleure compréhension de la maladie permettra à la fois d'améliorer le diagnostic, les traitements ainsi que le développement de nouvelles thérapies. A ce jour, l'anémie de Blackfan-Diamond n'est plus caractérisée comme la seule érythroblastopénie congénitale mais comme un syndrome ABD avec en son sein la classique ABD par mutation en un gène de RP et des ABD-like non liées à un gène de RP (gènes *GATA-1*, *EPO*, *CECR1*, *TP53*). La compréhension de la pathologie et l'identification des gènes impliqués dans les érythroblastopénies congénitales et notamment l'ABD faciliteront l'amélioration des traitements et le développement de nouvelles thérapies comme la thérapie génique.

BIBLIOGRAPHIE

Abboud, S. L., Bethel, C. R., & Aron, D. C. (1991). Secretion of insulinlike growth factor I and insulinlike growth factor-binding proteins by murine bone marrow stromal cells. *Journal of Clinical Investigation*. https://doi.org/10.1172/JCI115327

Abdulhay, N. J., Fiorini, C., Verboon, J. M., Ludwig, L. S., Ulirsch, J. C., Zieger, B., … Sankaran, V. G. (2019). Impaired human hematopoiesis due to a cryptic intronic GATA1 splicing mutation. *Journal of Experimental Medicine*, *216*(5), 1050–1060. https://doi.org/10.1084/jem.20181625

Aerbajinai, W., Giattina, M., Lee, Y. T., Raffeld, M., & Miller, J. L. (2003). The proapoptotic factor Nix is coexpressed with Bcl-xL during terminal erythroid differentiation. *Blood*, *102*(2), 712–717. https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3324

Agarraberes, F. A., & Dice, J. F. (2001). A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *Journal of Cell Science*, *114*(13), 2491–2499.

Albanèse, V., Yam, A. Y. W., Baughman, J., Parnot, C., & Frydman, J. (2006). Systems analyses reveal two chaperone networks with distinct functions in eukaryotic cells. *Cell*, *124*(1), 75–88. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.039

Alers, S., Loffler, A. S., Wesselborg, S., & Stork, B. (2012). Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks. *Molecular and Cellular Biology*, *32*(1), 2–11. https://doi.org/10.1128/mcb.06159-11

Ali, M. U., Ur Rahman, M. S., Jia, Z., & Jiang, C. (2017). Eukaryotic translation initiation factors and cancer. *Tumor Biology*, *39*(6). https://doi.org/10.1177/1010428317709805

Alkhatabi, H. A., McLornan, D. P., Kulasekararaj, A. G., Malik, F., Seidl, T., Darling, D., … Mufti, G. J. (2016). RPL27A is a target of miR-595 and may contribute to the myelodysplastic phenotype through ribosomal dysgenesis. *Oncotarget*, *7*(30), 47875–47890. https://doi.org/10.18632/oncotarget.10293

Alter, B. P., Giri, N., Savage, S. A., Peters, J. A., Loud, J. T., Leathwood, L., … Rosenberg, P. S. (2010). Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. *British Journal of Haematology*, *150*(2), 179–188. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08212.x

Amann, J. M., Nip, J., Strom, D. K., Lutterbach, B., Harada, H., Lenny, N., … Hiebert, S. W. (2001). ETO, a Target of t(8;21) in Acute Leukemia, Makes Distinct Contacts with Multiple Histone Deacetylases and Binds mSin3A through Its Oligomerization Domain. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(19), 6470–6483. https://doi.org/10.1128/mcb.21.19.6470-6483.2001

Amaravadi, R., & Thompson, C. B. (2005). The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *Journal of Clinical Investigation*, *115*(10), 2618–2624. https://doi.org/10.1172/JCI26273

Amsterdam, A., Sadler, K. C., Lai, K., Farrington, S., Bronson, R. T., Lees, J. A., & Hopkins, N. (2004). Many ribosomal protein genes are cancer genes in zebrafish. *PLoS Biology*, *2*(5). https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020139

Anderson, D. M., Williams, D. E., Tushinski, R., Gimpel, S., Eisenman, J., Cannizzaro, L. A., … Cosman, D. (1991). Alternate splicing of mRNAs encoding human mast cell growth factor and localization of the gene to chromosome 12q22-q24. *Cell Growth & Differentiation : The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*, *2*(8), 373–378.

Aron, D. C., Saadi, H. F., Nye, C. N., & Douglas, J. G. (1991). Secretion of insulin-like growth factor I and its binding proteins by collecting duct cells. *Kidney International*, *39*(1), 27–

32. https://doi.org/10.1038/ki.1991.3

Arts, K., Bergerson, J. R. E., Ombrello, A. K., Similuk, M., Oler, A. J., Agharahimi, A., … Meyts, I. (2018). Warts and DADA2: a Mere Coincidence? *Journal of Clinical Immunology*, *38*(8), 836–843. https://doi.org/10.1007/s10875-018-0565-0

Aspesi, A., Betti, M., Sculco, M., Actis, C., Olgasi, C., Wlodarski, M. W., … Dianzani, I. (2018). A functional assay for the clinical annotation of genetic variants of uncertain significance in Diamond–Blackfan anemia. *Human Mutation*. https://doi.org/10.1002/humu.23551

B. J. KENNEDY, M.D., t IRA T. NATHANSON, M.D., D. M. T., & and JOSEPH C. AUB, M. D. (1955). *Biochemical Alterations during Steroid Hormone Therapy of Advanced Breast Cancer*.*

Bachmann, M., & Möröy, T. (2005). The serine/threonine kinase Pim-1. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *37*(4), 726–730. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.11.005

Bai, D., Zhang, J., Xiao, W., & Zheng, X. (2014). Regulation of the HDM2-p53 pathway by ribosomal protein L6 in response to ribosomal stress. *Nucleic Acids Research*, *42*(3), 1799–1811. https://doi.org/10.1093/nar/gkt971

Baik, I. H., Jo, G. H., Seo, D., Ko, M. J., Cho, C. H., Lee, M. G., & Lee, Y. H. (2016). Knockdown of RPL9 expression inhibits colorectal carcinoma growth via the inactivation of Id-1/NF-κB signaling axis. *International Journal of Oncology*, *49*(5), 1953–1962. https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3688

Baker, N. E., Kiparaki, M., & Khan, C. (2019). A potential link between p53, cell competition and ribosomopathy in mammals and in Drosophila. *Developmental Biology*. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.11.018

Ball, S., & Orfali, K. (2004). Molecular diagnosis of Diamond-Blackfan anemia. *Methods in Molecular Medicine*. https://doi.org/10.1385/1-59259-433-6:19

Barcelo, Olivera., Bozzini, A. and C. E. B. (1999). *C OMPARATIVE Original Article Androgens and Erythropoiesis . Induction of Erythropoietin- Secretion*. 1–6.

Barnes, P. J. (2006). How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *British Journal of Pharmacology*, *148*(3), 245–254. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706736

Baßler, J., & Hurt, E. (2019). Eukaryotic Ribosome Assembly. *Annual Review of Biochemistry*, *88*(1), 281–306. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-110817

Batmunkh, C., Krajewski, J., Jelkmann, W., & Hellwig-Bürgel, T. (2006). Erythropoietin production: Molecular mechanisms of the antagonistic actions of cyclic adenosine monophosphate and interleukin-1. *FEBS Letters*, *580*(13), 3153–3160. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.069

Bauer, A., Tronche, F., Wessely, O., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Steinlein, P., … Beug, H. (1999). The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis. *Genes and Development*, *13*(22), 2996–3002. https://doi.org/10.1101/gad.13.22.2996

Bazan, J. F. (1989). A novel family of growth factor receptors: A common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor β-chain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *164*(2), 788–795. https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)91528-3

Becker, B. A. J., Mcculloch, E. A., & Till, J. E. (1963). *Spleen Colonies Derived From Transplanted Mouse*. *197*, 452–454.

Beckman, D. L., Lin, L. L., Quinones, M. E., & Longmore, G. D. (1999). Activation of the erythropoietin receptor is not required for internalization of bound erythropoietin. *Blood*, *94*(8), 2667–2675.

Beere, H. M., Wolf, B. B., Cain, K., Mosser, D. D., Mahboubi, A., Kuwana, T., … Green, D.

R. (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biology*, *2*(8), 469–475. https://doi.org/10.1038/35019501

Belaaloui, G., Imbert, A. M., Bardin, F., Tonnelle, C., Dubreuil, P., Lopez, M., & Chabannon, C. (2003). Functional characterization of human CD34+ cells that express low or high levels of the membrane antigen CD111 (nectin 1). *Leukemia*, *17*(6), 1137–1145. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402916

Ben-Shem, A., De Loubresse, N. G., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.1212642

Bennett, G. D., & Kay, M. M. B. (1981). Homeostatic removal of senescent murine erythrocytes by splenic macrophages. *Experimental Hematology*.

Benz, C., Copley, M. R., Kent, D. G., Wohrer, S., Cortes, A., Aghaeepour, N., … Eaves, C. J. (2012). Hematopoietic stem cell subtypes expand differentially during development and display distinct lymphopoietic programs. *Cell Stem Cell*, *10*(3), 273–283. https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.02.007

Bergamaschi, G., Di Sabatino, A., Albertini, R., Ardizzone, S., Biancheri, P., Bonetti, E., … Corazza, G. R. (2010). Prevalence and pathogenesis of anemia in inflammatory bowel disease. Influence of anti-tumor necrosis factor-α treatment. *Haematologica*, *95*(2), 199–205. https://doi.org/10.3324/haematol.2009.009985

Bessi M. (1958). [Erythroblastic island, functional unity of bone marrow]. Rev. Hématologie *13*, 8–11.

Beyer, A. R., Bann, D. V., Rice, B., Pultz, I. S., Kane, M., Goff, S. P., … Parent, L. J. (2013). Nucleolar Trafficking of the Mouse Mammary Tumor Virus Gag Protein Induced by Interaction with Ribosomal Protein L9. *Journal of Virology*, *87*(2), 1069–1082. https://doi.org/10.1128/jvi.02463-12

Bianchi, N., Zuccato, C., Lampronti, I., Borgatti, M., & Gambari, R. (n.d.). *Expression of miR-210 during erythroid differentiation and induction of γ -globin gene expression*. 493–499.

Biasco, L., Rothe, M., Büning, H., & Schambach, A. (2018). Analyzing the Genotoxicity of Retroviral Vectors in Hematopoietic Cell Gene Therapy. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, *8*(March), 21–30. https://doi.org/10.1016/j.omtm.2017.10.002

Birkmann, J., Oez, S., Smetak, M., Kaiser, G., Kappauf, H., & 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*. https://doi.org/10.1002/stem.150018

Black, J. J., Musalgaonkar, S., & Johnson, A. W. (2019). Tsr4 Is a Cytoplasmic Chaperone for the Ribosomal Protein Rps2 in Saccharomyces cerevisiae . *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 39. https://doi.org/10.1128/mcb.00094-19

Blanc, L., De Gassart, A., Géminard, C., Bette-Bobillo, P., & Vidal, M. (2005). Exosome release by reticulocytes - An integral part of the red blood cell differentiation system. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *35*(1), 21–26. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.04.008

Blank, U., & Karlsson, S. (2011). The role of Smad signaling in hematopoiesis and translational hematology. *Leukemia*, *25*(9), 1379–1388. https://doi.org/10.1038/leu.2011.95

Blank, Ulrika, & Karlsson, S. (2015). TGF-β signaling in the control of hematopoietic stem cells. *Blood*, *125*(23), 3542–3550. https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-618090

Blick, M., Sherwin, S. A., Rosenblum, M., & Gutterman, J. (1987). Phase I study of recombinant tumor necrosis factor in cancer patients. *Cancer Research*, *47*(11), 2986–2989. https://doi.org/10.1089/jir.1989.9.435

Blume-Jensen, P., Wernstedt, C., Heldin, C. H., & Ronnstrand, L. (1995). Identification of the

major phosphorylation sites for protein kinase C in Kit/stem cell factor receptor in vitro and in intact cells. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270, pp. 14192–14200. https://doi.org/10.1074/jbc.270.23.14192

Blume-Jensen, Peter, Rönnstrand, L., Gout, I., Waterfield, M. D., & Heldin, C. H. (1994). Modulation of Kit/stem cell factor receptor-induced signaling by protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(34), 21793–21802.

Bolze, A., Mahlaoui, N., Byun, M., Turner, B., Trede, N., Ellis, S. R., … Casanova, J. L. (2013). Ribosomal protein SA haploinsufficiency in humans with isolated congenital asplenia. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.1234864

Boulais, P. E., & Frenette, P. S. (2015). Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood*, *125*(17), 2621–2629. https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-570192

Bourque, D. K., Hartley, T., Nikkel, S. M., Pohl, D., Tétreault, M., Kernohan, K. D., & Dyment, D. A. (2018). A de novo mutation in RPL10 causes a rare X-linked ribosomopathy characterized by syndromic intellectual disability and epilepsy: A new case and review of the literature. *European Journal of Medical Genetics*. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.10.011

Bouvet, P., Diaz, J. J., Kindbeiter, K., Madjar, J. J., & Amalric, F. (1998). Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(30), 19025–19029. https://doi.org/10.1074/jbc.273.30.19025

Brannan, C., Lymant, S. D., Williamst, D. E., Eisenman, J., Andersont, D. M., Cosmant, D., … Copeland, N. G. (1991). *Steel-Dickie mutation encodes a c-Kit*. *88*(June), 4671–4674.

Bresnick, E. H., Lee, H. Y., Fujiwara, T., Johnson, K. D., & Keles, S. (2010). GATA switches as developmental drivers. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(41), 31087–31093. https://doi.org/10.1074/jbc.R110.159079

Breton-Gorius, J., Guichard, J., & Vainchenker, W. (1979). Absence of erythroblastic islands in plasma clot culture and their possible reconstitution after clot lysis. *Blood Cells*.

Brizzi, M. F., Dentelli, P., Rosso, A., Yarden, Y., & Pegoraro, L. (1999). STAT protein recruitment and activation in c-Kit deletion mutants. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(24), 16965–16972. https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.16965

Brocchieri, L., Conway De Macario, E., & Macario, A. J. L. (2008). Hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evolutionary Biology*, *8*(1), 1–20. https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-19

Broudy, V. C., Lin, N., Brice, M., Nakamoto, B., & Papayannopoulou, T. (1991). Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood*, *77*(12), 2583–2590.

Broudy, V. C., Lin, N. L., Bühring, H. J., Komatsu, N., & Kavanagh, T. J. (1998). Analysis of c-kit receptor dimerization by flourescence resonance energy transfer. *Blood*, *91*(3), 898–906.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., … Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell*, *96*(6), 857–868. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80595-4

Buck, I., Morceau, F., Cristofanon, S., Heintz, C., Chateauvieux, S., Reuter, S., … Diederich, M. (2008). Tumor necrosis factor α inhibits erythroid differentiation in human erythropoietin-dependent cells involving p38 MAPK pathway, GATA-1 and FOG-1 downregulation and GATA-2 upregulation. *Biochemical Pharmacology*, *76*(10), 1229–1239. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.08.025

Bueno, M. J., & Malumbres, M. (2011). Biochimica et Biophysica Acta MicroRNAs and the cell cycle. *BBA - Molecular Basis of Disease*, *1812*(5), 592–601.

https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.002
Bulut, E., Erden, A., Karadag, O., Oguz, K. K., & Ozen, S. (2019). Deficiency of adenosine deaminase 2; special focus on central nervous system imaging. *Journal of Neuroradiology*. https://doi.org/10.1016/j.neurad.2018.05.002
Bunn, H. F. (2013). Erythropoiethin. *Copld Spring Habour Perspectives in Medicine*, 1–20.
Burnstock, G. (2008). Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nature Reviews Drug Discovery*. https://doi.org/10.1038/nrd2605
Busch, K., Klapproth, K., Barile, M., Flossdorf, M., Holland-Letz, T., Schlenner, S. M., … Rodewald, H. R. (2015). Fundamental properties of unperturbed haematopoiesis from stem cells in vivo. *Nature*, *518*(7540), 542–546. https://doi.org/10.1038/nature14242
Buzzard, K. A., Giaccia, A. J., Killender, M., & Anderson, R. L. (1998). Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(27), 17147–17153. https://doi.org/10.1074/jbc.273.27.17147
Byrd, T. F., & Horwitz, M. A. (1993). Regulation of transferrin receptor expression and ferritin content in human mononuclear phagocytes: Coordinate upregulation by iron transferrin and downregulation by interferon gamma. *Journal of Clinical Investigation*, *91*(3), 969–976. https://doi.org/10.1172/JCI116318
Cai, L., Bai, H., Mahairaki, V., Gao, Y., He, C., Wen, Y., … Cheng, L. (2018). A Universal Approach to Correct Various HBB Gene Mutations in Human Stem Cells for Gene Therapy of Beta-Thalassemia and Sickle Cell Disease. *Stem Cells Translational Medicine*, *7*(1), 87–97. https://doi.org/10.1002/sctm.17-0066
Calviño, F. R., Kharde, S., Ori, A., Hendricks, A., Wild, K., Kressler, D., … Sinning, I. (2015a). Symportin 1 chaperones 5S RNP assembly during ribosome biogenesis by occupying an essential rRNA-binding site. *Nature Communications*, *6*, 2–9. https://doi.org/10.1038/ncomms7510
Calviño, F. R., Kharde, S., Ori, A., Hendricks, A., Wild, K., Kressler, D., … Sinning, I. (2015b). Symportin 1 chaperones 5S RNP assembly during ribosome biogenesis by occupying an essential rRNA-binding site. *Nature Communications*, *6*, 2–9. https://doi.org/10.1038/ncomms7510
Campagnoli, M. F., Ramenghi, U., Armiraglio, M., Quarello, P., Garelli, E., Carando, A., … Dianzani, I. (2008a). RPS19 mutations in patients with Diamond-Blackfan anemia. *Human Mutation*, *29*(7), 911–920. https://doi.org/10.1002/humu.20752
Campagnoli, M. F., Ramenghi, U., Armiraglio, M., Quarello, P., Garelli, E., Carando, A., … Dianzani, I. (2008b). RPS19 mutations in patients with Diamond-Blackfan anemia. *Human Mutation*, *29*(7), 911–920. https://doi.org/10.1002/humu.20752
Cantor, A. B., & Orkin, S. H. (2002). Transcriptional regulation of erythropoiesis: An affair involving multiple partners. *Oncogene*, *21*(21 REV. ISS. 2), 3368–3376. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205326
Caorsi, R., Penco, F., Schena, F., & Gattorno, M. (2016). Monogenic polyarteritis: The lesson of ADA2 deficiency. *Pediatric Rheumatology*, *14*(1). https://doi.org/10.1186/s12969-016-0111-7
Carlile, G. W., Smith, D. H., & Wiedmann, M. (2004). *Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation*. *103*(11), 4310–4317. https://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3362.Supported
Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., Wang, G., Hehir, K., Fusil, F., … Leboulch, P. (2010). Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β-thalassaemia. *Nature*, *467*(7313), 318–322. https://doi.org/10.1038/nature09328
Chaker-Margot, M., Hunziker, M., Barandun, J., Dill, B. D., & Klinge, S. (2015). Stage-specific assembly events of the 6-MDa small-subunit processome initiate eukaryotic ribosome biogenesis. *Nature Structural and Molecular Biology*, *22*(11), 920–923.

https://doi.org/10.1038/nsmb.3111
Chakraborty, A., Uechi, T., Higa, S., Torihara, H., & Kenmochi, N. (2009). Loss of ribosomal protein L11 affects zebrafish embryonic development through a p53-dependent apoptotic response. *PLoS ONE*, *4*(1). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004152
Challagundla, K. B., Sun, X.-X., Zhang, X., DeVine, T., Zhang, Q., Sears, R. C., & Dai, M.-S. (2011). Ribosomal Protein L11 Recruits miR-24/miRISC To Repress c-Myc Expression in Response to Ribosomal Stress. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(19), 4007–4021. https://doi.org/10.1128/mcb.05810-11
Chasis, J. A., & Mohandas, N. (2008). Erythroblastic islands: Niches for erythropoiesis. *Blood*, *112*(3), 470–478. https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-077883
Chateauvieux, S., Grigorakaki, C., Morceau, F., Dicato, M., & Diederich, M. (2011). Erythropoietin, erythropoiesis and beyond. *Biochemical Pharmacology*. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.06.045
Chatterjee, M., Mohapatra, S., Ionan, A., Bawa, G., Ali-Fehmi, R., Wang, X., … Tainsky, M. A. (2006). Diagnostic markers of ovarian cancer by high-throughput antigen cloning and detection on arrays. *Cancer Research*. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2962
Chen, D., Zhang, Z., Li, M., Wang, W., Li, Y., Rayburn, E. R., … Zhang, R. (2007). Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: Binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function. *Oncogene*, *26*(35), 5029–5037. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210327
Cheng, A., Chan, S. L., Milhavet, O., Wang, S., & Mattson, M. P. (2001). p38 MAP Kinase Mediates Nitric Oxide-induced Apoptosis of Neural Progenitor Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(46), 43320–43327. https://doi.org/10.1074/jbc.M107698200
Chin, H., Arai, A., Wakao, H., Kamiyama, R., Miyasaka, N., & Miura, O. (1998). Lyn physically associates with the erythropoietin receptor and may play a role in activation of the Stat5 pathway. *Blood*, *91*(10), 3734–3745.
Chiocchetti, A., Gibello, L., Carando, A., Aspesi, A., Secco, P., Garelli, E., … Dianzani, I. (2005). Interactions between RPS19, mutated in Diamond-Blackfan anemia, and the PIM-1 oncoprotein. *Haematologica*, *90*(11), 1453–1462.
Cho, W., Jin, X., Pang, J., Wang, Y., Mivechi, N. F., & Moskophidis, D. (2019). The Molecular Chaperone Heat Shock Protein 70 Controls Liver Cancer Initiation and Progression by Regulating Adaptive DNA Damage and Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Pathways. *Molecular and Cellular Biology*, *39*(9), 1–33. https://doi.org/10.1128/MCB.00391-18
Choesmel, V., Bacqueville, D., Rouquette, J., Noaillac-Depeyre, J., Fribourg, S., Crétien, A., … Gleizes, P. E. (2007). Impaired ribosome biogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Blood*, *109*(3), 1275–1283. https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-038372
Choesmel, V., Fribourg, S., Aguissa-Touré, A. H., Pinaud, N., Legrand, P., Gazda, H. T., & Gleizes, P. E. (2008). Mutation of ribosomal protein RPS24 in Diamond-Blackfan anemia results in a ribosome biogenesis disorder. *Human Molecular Genetics*, *17*(9), 1253–1263. https://doi.org/10.1093/hmg/ddn015
Choque, E., Schneider, C., Gadal, O., & Dez, C. (2018). Turnover of aberrant pre-40S pre-ribosomal particles is initiated by a novel endonucleolytic decay pathway. *Nucleic Acids Research*, *46*(9), 4699–4714. https://doi.org/10.1093/nar/gky116
Chow, A., Huggins, M., Ahmed, J., Hashimoto, D., Lucas, D., Kunisaki, Y., … Frenette, P. S. (2013). CD169 + macrophages provide a niche promoting erythropoiesis under homeostasis and stress. *Nature Medicine*, *19*(4), 429–436. https://doi.org/10.1038/nm.3057
Ciganda, M., & Williams, N. (2011). Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, *2*(4), 523–533. https://doi.org/10.1002/wrna.74

Ciresi, A., Piazza, G., Radellini, S., Guarnotta, V., Mineo, M. G., & Giordano, C. (2018). Growth Hormone & IGF Research Growth hormone and hematopoiesis : A retrospective analysis on a large cohort of children with growth hormone de fi ciency. *Growth Hormone & IGF Research*, *42–43*(May), 8–13. https://doi.org/10.1016/j.ghir.2018.07.005

Civin, C. I., Trischmann, T., Kadan, N. S., Davis, J., Noga, S., Cohen, K., … Gee, A. (1996). Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis. *Journal of Clinical Oncology*, *14*(8), 2224–2233. https://doi.org/10.1200/JCO.1996.14.8.2224

Claassen, D., Boals, M., Bowling, K. M., Cooper, G. M., Cox, J., Hershfield, M., … Estepp, J. H. (2018). Complexities of genetic diagnosis illustrated by an atypical case of congenital hypoplastic anemia. *Cold Spring Harbor Molecular Case Studies*, *4*(6), 1–7. https://doi.org/10.1101/mcs.a003384

Clinton, C., & Gazda, H. T. (2019). *Diamond-Blackfan Anemia Summary Diagnosis Suggestive Findings*. 1–29.

Cmejla, R., Blafkova, J., Stopka, T., Zavadil, J., Pospisilova, D., Mihal, V., … Jelinek, J. (2000). Ribosomal protein S19 gene mutations in patients with Diamond-Blackfan anemia and identification of ribosomal protein S19 pseudogenes. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *26*(2), 124–132. https://doi.org/10.1006/bcmd.2000.0286

Cmejla, Radek, Cmejlova, J., Handrkova, H., Petrak, J., Petrtylova, K., Mihal, V., … Pospisilova, D. (2009). Identification of mutations in the ribosomal protein L5 (RPL5) and ribosomal protein L11 (RPL11) genes in Czech patients with diamond-blackfan anemia. *Human Mutation*, *30*(3), 321–327. https://doi.org/10.1002/humu.20874

Cmejla, Radek, Cmejlova, J., Handrkova, H., Petrak, J., & Pospisilova, D. (2007). Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Human Mutation*, *28*(12), 1178–1182. https://doi.org/10.1002/humu.20608

Constantinescu, S. N., Ghaffari, S., & Lodish, H. F. (1999). The erythropoietin receptor: Structure, activation and intracellular signal transduction. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *10*(1), 18–23. https://doi.org/10.1016/S1043-2760(98)00101-5

Corrado, A., Di Bello, V., D'Onofrio, F., Maruotti, N., & Cantatore, F. P. (2017). Anti-TNF-α effects on anemia in rheumatoid and psoriatic arthritis. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, *30*(3), 302–307. https://doi.org/10.1177/0394632017714695

Correa, P. N., & 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*(11), 2823–2833.

Costa, L Da, Tchernia, G., Gascard, P., Lo, A., Blood, J. M.-, & 2003, undefined. (2003). Nucleolar localization of RPS19 protein in normal cells and mislocalization due to mutations in the nucleolar localization signals in 2 Diamond-Blackfan anemia. *Am Soc Hematology*, *101*(12), 5039–5045. https://doi.org/10.1182/blood-2002-12-3878.Supported

Costa, Lydie Da, Mohandas, N., Sorette, M., & Tchernia, G. (2001). Hereditary Spherocytosis and in Immune Hemolytic Anemia. *Cell*, *98*(10), 2894–2899.

Coviello, A. D., Kaplan, B., Lakshman, K. M., Chen, T., Singh, A. B., & Bhasin, S. (2008). Effects of graded doses of testosterone on erythropoiesis in healthy young and older men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *93*(3), 914–919. https://doi.org/10.1210/jc.2007-1692

Crétien, A., Hurtaud, C., Moniz, H., Proust, A., Marie, I., Wagner-Ballon, O., … Da Costa, L. (2008). Study of the effects of proteasome inhibitors on ribosomal protein S19 (RPS19) mutants, identified in patients with Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica*, *93*(11), 1627–1634. https://doi.org/10.3324/haematol.13023

Crétien, A., Proust, A., Delaunay, J., Rincé, P., Leblanc, T., Ducrocq, R., … Da Costa, L.

(2010). Genetic variants in the noncoding region of RPS19 gene in Diamond-Blackfan anemia: Potential implications for phenotypic heterogeneity. *American Journal of Hematology*, *85*(2), 111–116. https://doi.org/10.1002/ajh.21601

Cui, D., Li, L., Lou, H., Sun, H., Ngai, S. M., Shao, G., & Tang, J. (2014). The ribosomal protein S26 regulates p53 activity in response to DNA damage. *Oncogene*, *33*(17), 2225–2235. https://doi.org/10.1038/onc.2013.170

D'allard, D., Gay, J., Descarpentries, C., Frisan, E., Adam, K., Verdier, F., … Kosmider, O. (2013). Tyrosine Kinase Inhibitors Induce Down-Regulation of c-Kit by Targeting the ATP Pocket. *PLoS ONE*, *8*(4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060961

D'Andrea, A. D., Lodish, H. F., & Wong, G. G. (1989). Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell*, *57*(2), 277–285. https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90965-3

Da Costa, L., Moniz, H., Simansour, M., Tchernia, G., Mohandas, N., & Leblanc, T. (2010). Diamond-Blackfan anemia, ribosome and erythropoiesis. *Transfusion Clinique et Biologique*, *17*(3), 112–119. https://doi.org/10.1016/j.tracli.2010.06.001

Da Costa, Lydie, 'Ve Chanoz-Poulard, G., Simansour, M., French, M., Bouvier, R., Prieur, F., … Touraine, R. (2013). First de novo mutation in RPS19 gene as the cause of hydrops fetalis in Diamond-Blackfan anemia. *American Journal of Hematology*. https://doi.org/10.1002/ajh.23366

Da Costa, Lydie, O'Donohue, M. F., van Dooijeweert, B., Albrecht, K., Unal, S., Ramenghi, U., … MacInnes, A. W. (2018). Molecular approaches to diagnose Diamond-Blackfan anemia: The EuroDBA experience. *European Journal of Medical Genetics*, *61*(11), 664–673. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.10.017

Daftuar, L., Zhu, Y., Jacq, X., & Prives, C. (2013). Ribosomal Proteins RPL37, RPS15 and RPS20 Regulate the Mdm2-p53-MdmX Network. *PLoS ONE*, *8*(7). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068667

Dai, M.-S., Zeng, S. X., Jin, Y., Sun, X.-X., David, L., & Lu, H. (2004). Ribosomal Protein L23 Activates p53 by Inhibiting MDM2 Function in Response to Ribosomal Perturbation but Not to Translation Inhibition. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(17), 7654–7668. https://doi.org/10.1128/mcb.24.17.7654-7668.2004

Dai, M. S., Arnold, H., Sun, X. X., Sears, R., & Lu, H. (2007). Inhibition of c-Myc activity by ribosomal protein L11. *EMBO Journal*, *26*(14), 3332–3345. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601776

Danilova, N., Sakamoto, K. M., & Lin, S. (2008). Ribosomal protein S19 deficiency in zebrafish leads to developmental abnormalities and defective erythropoiesis through activation of p53 protein family. *Blood*, *112*(13), 5228–5237. https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-132290

Danilova, N., Sakamoto, K. M., & Lin, S. (2011). Ribosomal protein L11 mutation in zebrafish leads to haematopoietic and metabolic defects. *British Journal of Haematology*, *152*(2), 217–228. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08396.x

Daugaard, M., Rohde, M., & Jäättelä, M. (2007). The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Letters*, *581*(19), 3702–3710. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.039

De Keersmaecker, K., Atak, Z. K., Li, N., Vicente, C., Patchett, S., Girardi, T., … Cools, J. (2013). Exome sequencing identifies mutation in CNOT3 and ribosomal genes RPL5 and RPL10 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*. https://doi.org/10.1038/ng.2508

de Kruijf, E. J. F. M., Fibbe, W. E., & van Pel, M. (2019). Cytokine-induced hematopoietic stem and progenitor cell mobilization: unraveling interactions between stem cells and their niche. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1–15.

https://doi.org/10.1111/nyas.14059
de la Chapelle, A., Sistonen, P., Lehväslaiho, H., Ikkala, E., & Juvonen, E. (1993). Familial erythrocytosis genetically linked to erythropoietin receptor gene. *The Lancet*, *341*(8837), 82–84. https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)92558-B
De Latour, R. P. (2016). Transplantation for bone marrow failure: Current issues. *Hematology*, *2016*(1), 90–98. https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.90
De Maria, R., Testa, U., Luchetti, L., Zeuner, A., Stassi, G., Pelosi, E., … Peschle, C. (1999). Apoptotic Role of Fas/Fas Ligand System in the Regulation of Erythropoiesis. *Blood*, *93*(3), 796–803. https://doi.org/10.1182/blood.V93.3.796.403k23_796_803
DeBerry, C., Mou, S., & Linnekin, D. (1997). Stat1 associates with c-kit and is activated in response to stem cell factor. *Biochemical Journal*, *327*(1), 73–80. https://doi.org/10.1042/bj3270073
Delaporta, P., Sofocleous, C., Stiakaki, E., Polychronopoulou, S., Economou, M., Kossiva, L., … Kattamis, A. (2014). Clinical phenotype and genetic analysis of RPS19 , RPL5 , and RPL11 genes in Greek patients with Diamond Blackfan Anemia. *Pediatric Blood & Cancer*, *61*(12), 2249–2255. https://doi.org/10.1002/pbc.25183
Derijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I., Han, J., Ulevitch, R., & Davis, R. (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science*, *267*(5198), 682–685. https://doi.org/10.1126/science.7839144
Devillier, R., Dalle, J. H., Kulasekararaj, A., D'aveni, M., Clément, L., Chybicka, A., … De Latour, R. P. (2016). Unrelated alternative donor transplantation for severe acquired aplastic anemia: A study from the french society of bone marrow transplantation and cell therapies and the EBMT severe aplastic anemia working party. *Haematologica*, *101*(7), 884–890. https://doi.org/10.3324/haematol.2015.138727
Devlin, E. E., DaCosta, L., Mohandas, N., Elliott, G., & Bodine, D. M. (2010). A transgenic mouse model demonstrates a dominant negative effect of a point mutation in the RPS19 gene associated with Diamond-Blackfan anemia. *Blood*, *116*(15), 2826–2835. https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-275776
Diamond LK, Blackfan KD. Hypoplastic anemia. Am J Dis Child. 1938; 56 : 464
Diamond, L. K., Wang, W. C., & Alter, B. P. (1976). Congenital hypoplastic anemia. *Advances in Pediatrics*. https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1957.tb00552.x
Diwan, A., Koesters, A. G., Odley, A. M., Pushkaran, S., Baines, C. P., Spike, B. T., … Dorn, G. W. (2007). Unrestrained erythroblast development in Nix-/- mice reveals a mechanism for apoptotic modulation of erythropoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(16), 6794–6799. https://doi.org/10.1073/pnas.0610666104
Doherty, L., Sheen, M. R., Vlachos, A., Choesmel, V., O'Donohue, M. F., Clinton, C., … Gazda, H. T. (2010). Ribosomal Protein Genes RPS10 and RPS26 Are Commonly Mutated in Diamond-Blackfan Anemia. *American Journal of Human Genetics*, *86*(2), 222–228. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.12.015
Doi, Y., Yokota, T., Satoh, Y., Okuzaki, D., Tokunaga, M., Ishibashi, T., … Kanakura, Y. (2018). Variable SATB1 Levels Regulate Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity with Distinct Lineage Fate. *Cell Reports*, *23*(11), 3223–3235. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.042
Dolznig, H., Habermann, B., Stangl, K., Deiner, E. M., Moriggl, R., Beug, H., & Müllner, E. W. (2002). Apoptosis protection by the Epo target Bcl-XL allows factor-independent differentiation of primary erythroblasts. *Current Biology*, *12*(13), 1076–1085. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00930-2
Dombret 1996
Domen, J., & Weissman, I. L. (2000). Hematopoietic stem cells need two signals to prevent

apoptosis; BCL-2 can provide one of these, Kitl/c-Kit signaling the other. *Journal of Experimental Medicine*, *192*(12), 1707–1718. https://doi.org/10.1084/jem.192.12.1707

Dore, L. C., Amigo, J. D., Dos Santos, C. O., Zhang, Z., Gai, X., Tobias, J. W., … Weiss, M. J. (2008). A GATA-1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(9), 3333–3338. https://doi.org/10.1073/pnas.0712312105

Doty, R. T., Yan, X., Lausted, C., Munday, A. D., Yang, Z., Yi, D., … Abkowitz, J. L. (2019). Single-cell analyses demonstrate that a heme–GATA1 feedback loop regulates red cell differentiation. *Blood*, *133*(5), 457–469. https://doi.org/10.1182/blood-2018-05-850412

Doulatov, S., Vo, L. T., Macari, E. R., Wahlster, L., Kinney, M. A., Taylor, A. M., … Daley, G. Q. (2017). Drug discovery for Diamond-Blackfan anemia using reprogrammed hematopoietic progenitors. *Science Translational Medicine*, *9*(376). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah5645

Draptchinskaia, N., Gustavsson, P., Andersson, B., Pettersson, M., Willig, T. N., Dianzani, I., … Dahl, N. (1999). The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nature Genetics*, *21*(2), 169–175. https://doi.org/10.1038/5951

Duan, J., Ba, Q., Wang, Z., Hao, M., Li, X., Hu, P., … Wang, H. (2011). Knockdown of ribosomal protein S7 causes developmental abnormalities via p53 dependent and independent pathways in zebrafish. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *43*(8), 1218–1227. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.04.015

Dutt, S., Narla, A., Lin, K., Mullally, A., Abayasekara, N., Megerdichian, C., … Ebert, B. L. (2011). Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood*, *117*(9), 2567–2576. https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-295238

Dykstra, B., Kent, D., Bowie, M., McCaffrey, L., Hamilton, M., Lyons, K., … Eaves, C. (2007). Long-Term Propagation of Distinct Hematopoietic Differentiation Programs In Vivo. *Cell Stem Cell*. https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.05.015

Dzierzak E, Philipsen S. Erythropoiesis : Development and Differentiation. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2013 Apr 1; 3(4) : a011601–a01160

Ebert, B. L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C. Y., Tamayo, P., Galili, N., … Golub, T. R. (2008). Identification of RPS14 as a 5q - syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*. https://doi.org/10.1038/nature06494

Eid, R., Sheibani, S., Gharib, N., Lapointe, J. F., Horowitz, A., Vali, H., … Greenwood, M. T. (2014). Human ribosomal protein L9 is a Bax suppressor that promotes cell survival in yeast. *FEMS Yeast Research*, *14*(3), 495–507. https://doi.org/10.1111/1567-1364.12121

Ellis, R. J., & Hemmingsen, S. M. (1989). Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends in Biochemical Sciences*, *14*(8), 339–342. https://doi.org/10.1016/0968-0004(89)90168-0

Ellis, S. R. (2014). Nucleolar stress in diamond blackfan anemia pathophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1842*(6), 765–768. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.12.013

Eltzschig, H. K., Sitkovsky, M. V., & Robson, S. C. (2013). Purinergic Signaling during Inflammation. *New England Journal of Medicine*, *368*(13), 1260–1260. https://doi.org/10.1056/NEJMc1300259

Ema, H., Morita, Y., & Suda, T. (2014). Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology*. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2013.11.004

Engström, M., Karlsson, R., & Jönsson, J. I. (2003). Inactivation of the forkhead transcription factor FoxO3 is essential for PKB-mediated survival of hematopoietic progenitor cells by kit ligand. *Experimental Hematology*, *31*(4), 316–323. https://doi.org/10.1016/S0301-472X(03)00002-X

Evans, T., Reitman, M., & Felsenfeld, G. (1988). An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes (enhancer/tissue-specific transcription factor/gene expression). *Developmental Biology*, *85*(August), 5976–5980. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC281888/pdf/pnas00295-0226.pdf

Fagioli, F., Quarello, P., Zecca, M., Lanino, E., Corti, P., Favre, C., … Prete, A. (2014). Haematopoietic stem cell transplantation for Diamond Blackfan anaemia: A report from the Italian Association of Paediatric Haematology and Oncology Registry. *British Journal of Haematology*, *165*(5), 673–681. https://doi.org/10.1111/bjh.12787

Faivre, L., Meerpohl, J., Da Costa, L., Marie, I., Nouvel, C., Gnekow, A., … Leblanc, T. (2006). High-risk pregnancies in Diamond-Blackfan anemia: A survey of 64 pregnancies from the French and German registries. *Haematologica*, *91*(4), 530–533.

Fancello, L., Kampen, K. R., Hofman, I. J. F., Verbeeck, J., & De Keersmaecker, K. (2017). The ribosomal protein gene RPL5 is a haploinsufficient tumor suppressor in multiple cancer types. *Oncotarget*. https://doi.org/10.18632/oncotarget.14895

Fang, H., Wu, Y., Huang, X., Wang, W., Ang, B., Cao, X., & Wan, T. (2011). Toll-like receptor 4 (TLR4) is essential for Hsp70-like protein 1 (HSP70L1) to activate dendritic cells and induce Th1 response. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(35), 30393–30400. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.266528

Fang, J., Menon, M., Kapelle, W., Bogacheva, O., Bogachev, O., Houde, E., … Wojchowski, D. M. (2007). EPO modulation of cell-cycle regulatory genes, and cell division, in primary bone marrow erythroblasts. *Blood*, *110*(7), 2361–2370. https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-063503

Fareh, M., Yeom, K., Haagsma, A. C., Chauhan, S., Heo, I., & Joo, C. (2016). TRBP ensures efficient Dicer processing environments. *Nature Communications*, *7*, 1–11. https://doi.org/10.1038/ncomms13694

Fargo, J. H., Kratz, C. P., Giri, N., Savage, S. A., Wong, C., Backer, K., … Glader, B. (2013). Erythrocyte adenosine deaminase: Diagnostic value for Diamond-Blackfan anaemia. *British Journal of Haematology*, *160*(4), 547–554. https://doi.org/10.1111/bjh.12167

Farley, K. I., & Baserga, S. J. (2016). Probing the mechanisms underlying human diseases in making ribosomes. *Biochemical Society Transactions*, *44*(4), 1035–1044. https://doi.org/10.1042/BST20160064

Farrar, J. E., Nater, M., Caywood, E., Mcdevitt, M. A., Kowalski, J., Takemoto, C. M., … Arceci, R. J. (2008). Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, rpl35a, in diamond-blaekfan anemia. *Blood*, *112*(5), 1582–1592. https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-140012

Fazi, F., Rosa, A., Fatica, A., Gelmetti, V., De Marchis, M. L., Nervi, C., & Bozzoni, I. (2005). A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPα regulates human granulopoiesis. *Cell*, *123*(5), 819–831. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.023

Fedoriw, A. M., Starmer, J., Yee, D., & Magnuson, T. (2012). Nucleolar association and transcriptional inhibition through 5S rDNA in mammals. *PLoS Genetics*, *8*(1). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002468

Felli, N., Fontana, L., Pelosi, E., Botta, R., Bonci, D., Facchiano, F., … Peschle, C. (2005). MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(50), 18081–18086. https://doi.org/10.1073/pnas.0506216102

Felli, N., Pedini, F., Romania, P., Biffoni, M., Morsilli, O., Castelli, G., … Marziali, G. (2009). MicroRNA 223-dependent expression of LMO2 regulates normal erythropoiesis. *Haematologica*, *94*(4), 479–486. https://doi.org/10.3324/haematol.2008.002345

Felli, N., Pedini, F., Zeuner, A., Petrucci, E., Testa, U., Conticello, C., … De Maria, R. (2005). Multiple Members of the TNF Superfamily Contribute to IFN-γ-Mediated Inhibition of Erythropoiesis. *The Journal of Immunology*, *175*(3), 1464–1472. https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.3.1464

Fernández, K. S., & de Alarcón, P. A. (2013). Development of the hematopoietic system and disorders of hematopoiesis that present during infancy and early childhood. *Pediatric Clinics of North America*, *60*(6), 1273–1289. https://doi.org/10.1016/j.pcl.2013.08.002

Ferreira, A. M., Tuominen, I., van Dijk-Bos, K., Sanjabi, B., van der Sluis, T., van der Zee, A. G., … Hofstra, R. M. W. (2014). High frequency of RPL22 mutations in microsatellite-unstable colorectal and endometrial tumors. *Human Mutation*. https://doi.org/10.1002/humu.22686

Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M., & Philipsen, S. (2005). GATA1 Function , a Paradigm for Transcription Factors in Hematopoiesis. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(4), 1215–1227. https://doi.org/10.1128/MCB.25.4.1215

Finger, C., Escher, C., & Schneider, D. (2009). The single transmembrane domains of human receptor tyrosine kinases encode self-interactions. *Science Signaling*, *2*(89). https://doi.org/10.1126/scisignal.2000547

FISHER, Y. Mor. A. J. W. (1975). *Increase in Erythroid Colony Formation in Rabbits Following the Administration of Testosterone'*. *180*, 178–180.

Flanagan, J. G., Chan, D. C., & Leder, P. (1991). Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the SId mutant. *Cell*, *64*(5), 1025–1035. https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90326-T

Flygare, J., Estrada, V. R., Shin, C., Gupta, S., & Lodish, H. F. (2011). HIF1α synergizes with glucocorticoids to promote BFU-E progenitor self-renewal. *Blood*, *117*(12), 3435–3444. https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-295550

Flygare, J., Olsson, K., Richter, J., & Karlsson, S. (2008). Gene therapy of Diamond Blackfan anemia CD34+ cells leads to improved erythroid development and engraftment following transplantation. *Experimental Hematology*, *36*(11), 1428–1435. https://doi.org/10.1016/J.EXPHEM.2008.06.012

Fox, A. H., Liew, C., Holmes, M., Kowalski, K., Mackay, J., & Crossley, M. (1999). Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. *EMBO Journal*, *18*(10), 2812–2822. https://doi.org/10.1093/emboj/18.10.2812

Frampton, J., Walker, M., Plumb, M., & Harrison, P. R. (1990). Synergy between the NF-E1 erythroid-specific transcription factor and the CACCC factor in the erythroid-specific promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Molecular and Cellular Biology*, *10*(7), 3838–3842. https://doi.org/10.1128/mcb.10.7.3838

Franco, R., Pacheco, R., Gatell, J. M., Gallart, T., & Lluis, C. (2007). Enzymatic and extraenzymatic role of adenosine deaminase 1 in T-cell-dendritic cell contacts and in alterations of the immune function. *Critical Reviews in Immunology*. https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v27.i6.10

Fredholm, B. B. (2007). Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death and Differentiation*. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402132

Frisan, E., Vandekerckhove, J., De Thonel, A., Pierre-Eugène, C., Sternberg, A., Arlet, J. B., … Fontenay, M. (2012). Defective nuclear localization of Hsp70 is associated with dyserythropoiesis and GATA-1 cleavage in myelodysplastic syndromes. *Blood*, *119*(6), 1532–1542. https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-343475

Fujiwara, T., Alqadi, Y. W., Okitsu, Y., Fukuhara, N., Onishi, Y., Ishizawa, K., & Harigae, H. (2013). Role of transcriptional corepressor ETO2 in erythroid cells. *Experimental Hematology*, *41*(3), 303-315.e1. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2012.10.015

Fujiwara, T., Lee, H. Y., Sanalkumar, R., & Bresnick, E. H. (2010). Building multifunctionality into a complex containing master regulators of hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(47), 20429–20434. https://doi.org/10.1073/pnas.1007804107

Fujiwara, T., Sasaki, K., Saito, K., Hatta, S., Ichikawa, S., Kobayashi, M., … Harigae, H. (2017). Forced FOG1 expression in erythroleukemia cells: Induction of erythroid genes and repression of myelo-lymphoid transcription factor PU.1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *485*(2), 380–387. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.068

Fujiwara, Y., Chang, A. N., Williams, A. M., & Orkin, S. H. (2004a). Functional overlap of GATA-1 and GATA-2 in primitive hematopoietic development. *Blood*, *103*(2), 583–585. https://doi.org/10.1182/blood-2003-08-2870

Fujiwara, Y., Chang, A. N., Williams, A. M., & Orkin, S. H. (2004b). Functional overlap of GATA-1 and GATA-2 in primitive hematopoietic development. *Blood*, *103*(2), 583–585. https://doi.org/10.1182/blood-2003-08-2870

Gabbianelli, M., Pelosi, E., Valtieri, M., Peschle, C., Testa, U., Fossati, C., … Rosato, V. (1996). Expression of growth factor receptors in unilineage differentiation culture of purified hematopoietic progenitors. *Blood*, *88*(9), 3391–3406. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8896404

Gadal, O., Strau , D., Kessl, J., Trumpower, B., Tollervey, D., & Hurt, E. (2001). Nuclear Export of 60S Ribosomal Subunits Depends on Xpo1p and Requires a Nuclear Export Sequence-Containing Factor, Nmd3p, That Associates with the Large Subunit Protein Rpl10p. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(10), 3405–3415. https://doi.org/10.1128/mcb.21.10.3405-3415.2001

Gamalinda, M., Ohmayer, U., Jakovljevic, J., Kumcuoglu, B., Woolford, J., Mbom, B., … Woolford, J. L. (2014). A hierarchical model for assembly of eukaryotic 60S ribosomal subunit domains. *Genes and Development*, *28*(2), 198–210. https://doi.org/10.1101/gad.228825.113

Ganguli, G., Back, J., Sengupta, S., & Wasylyk, B. (2002). The p53 tumour suppressor inhibits glucocorticoid-induced proliferation of erythroid progenitors. *EMBO Reports*, *3*(6), 569–574. https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf114

Gao, Y., Han, C., Huang, H., Xin, Y., Xu, Y., Luo, L., & Yin, Z. (2010). Heat shock protein 70 together with its co-chaperone CHIP inhibits TNF-α induced apoptosis by promoting proteasomal degradation of apoptosis signal-regulating kinase1. *Apoptosis*, *15*(7), 822–833. https://doi.org/10.1007/s10495-010-0495-7

Garçon, L., Ge, J., Manjunath, S. H., Mills, J. A., Apicella, M., Parikh, S., … Weiss, M. J. (2013). Ribosomal and hematopoietic defects in induced pluripotent stem cells derived from Diamond Blackfan anemia patients. *Blood*, *122*(6), 912–921. https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-478321

Garçon, L., Rivat, C., James, C., Lacout, C., Camara-Clayette, V., Ugo, V., … Vainchenker, W. (2006). Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. *Blood*, *108*(5), 1551–1554. https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-009514

Gasser C. (1951). [Aplastic anemia (chronic erythroblastophthisis) and cortisone]. Schweiz. Med. Wochenschr. *81*, 1241–1242.

Gastou, M., Rio, S., Dussiot, M., Karboul, N., Moniz, H., Leblanc, T., … Da Costa, L. (2017). The severe phenotype of Diamond-Blackfan anemia is modulated by heat shock protein 70. *Blood Advances*, *1*(22), 1959–1976. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017008078

Gazda, H. T., Grabowska, A., Merida-Long, L. B., Latawiec, E., Schneider, H. E., Lipton, J. M., … Sieff, C. A. (2006). Ribosomal protein S24 gene is mutated in Diamond-Blackfan

anemia. *American Journal of Human Genetics*, *79*(6), 1110–1118. https://doi.org/10.1086/510020

Gazda, H. T., Preti, M., Sheen, M. R., O'Donohue, M.-F., Vlachos, A., Davies, S. M., … Beggs, A. H. (2012). Frameshift mutation in p53 regulator RPL26 is associated with multiple physical abnormalities and a specific pre-ribosomal RNA processing defect in diamond-blackfan anemia. *Human Mutation*, *33*(7), 1037–1044. https://doi.org/10.1002/humu.22081

Gazda, H. T., Sheen, M. R., Vlachos, A., Choesmel, V., O'Donohue, M. F., Schneider, H., … Beggs, A. H. (2008). Ribosomal Protein L5 and L11 Mutations Are Associated with Cleft Palate and Abnormal Thumbs in Diamond-Blackfan Anemia Patients. *American Journal of Human Genetics*, *83*(6), 769–780. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.11.004

Geissler, K., Öhler, L., Födinger, M., Kabrna, E., Kollars, M., Skoupy, S., & Lechner, K. (1998). Interleukin-10 inhibits erythropoietin-independent growth of erythroid bursts in patients with polycythemia vera. *Blood*, *92*(6), 1967–1972.

Gekas, C., Dieterlen-Lièvre, F., Orkin, S. H., & Mikkola, H. K. A. (2005). The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Developmental Cell*, *8*(3), 365–375. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.12.016

Geng, Y., & Weinberg, R. A. (1993). Transforming growth factor β effects on expression of G1 cyclins and cyclin-dependent protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(21), 10315–10319. https://doi.org/10.1073/pnas.90.21.10315

Ghurye, R. R., Sundaram, K., Smith, F., Clark, B., Simpson, M. A., Fairbanks, L., … Ibrahim, M. A. A. (2019). Novel ADA2 mutation presenting with neutropenia, lymphopenia and bone marrow failure in patients with deficiency in adenosine deaminase 2 (DADA2). *British Journal of Haematology*. https://doi.org/10.1111/bjh.15896

Gibellini, D., Bassini, A., Re, M. C., Ponti, C., & Miscia, S. (2000). *Stroma-derived factor 1 a induces a selective inhibition of human erythroid development via the functional upregulation of Fas / CD95 ligand*. 432–440.

Giebel, L. B., Strunk, K. M., Holmes, S. A., & Spritz, R. A. (1992). Organization and nucleotide sequence of the human KIT (mast/stem cell growth factor receptor) proto-oncogene. *Oncogene*.

Gill, T., Cai, T., Aulds, J., Wierzbicki, S., & Schmitt, M. E. (2004). RNase MRP Cleaves the CLB2 mRNA To Promote Cell Cycle Progression: Novel Method of mRNA Degradation. *Molecular and Cellular Biology*. https://doi.org/10.1128/mcb.24.3.945-953.2004

Gilley, J., Coffer, P. J., & Ham, J. (2003). FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *Journal of Cell Biology*, *162*(4), 613–622. https://doi.org/10.1083/jcb.200303026

Glader, B. E., & Backer, K. (1988). Elevated red cell adenosine deaminase activity: A marker of disordered erythropiesis in Diamond-Blackfan anaemia and other haematologic diseases. *British Journal of Haematology*, *68*(2), 165–168. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1988.tb06184.x

Gnanapragasam, M. N., & Bieker, J. J. (2017). Orchestration of late events in erythropoiesis by KLF1/EKLF. *Current Opinion in Hematology*, *24*(3), 183–190. https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000327

Gnanapragasam, M. N., Mcgrath, K. E., Catherman, S., Xue, L., Palis, J., & Bieker, J. J. (2016). *Regular Article RED CELLS , IRON , AND ERYTHROPOIESIS EKLF / KLF1-regulated cell cycle exit is essential for erythroblast enucleation*. *128*(12), 1631–1642. https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-706671.The

Godin, I., & Cumano, A. (2007). Hematopoietic stem cells: Where do they come from at last? *Medecine/Sciences*, *23*(8–9), 681–684. https://doi.org/10.1051/medsci/20072389681

Golde DW, Bersch N, L. C. (1977). *Growth Hormone: Species-Specific Stimulation of Erythropoiesis in vitro*. *196*(December 1976), 1112–1113.

Gorlich, D. (1998). MEDAL REVIEW Transport into and out of the cell nucleus. *The EMBO Journal*, *17*(10), 2721–2727.

Görlich, D. (1997). Nuclear protein import. *Current Opinion in Cell Biology*, *9*(3), 412–419. https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80015-4

Görlich, M. (1996). Nucleocytoplasmic Transport. *Science*, *271*(5255), 1477. https://doi.org/10.1126/science.271.5255.1477

Gothwal, M., Wehrle, J., Aumann, K., Zimmermann, V., Gründer, A., & Pahl, H. L. (2016). A novel role for nuclear factor-erythroid 2 in erythroid maturation by modulation of mitochondrial autophagy. *Haematologica*, *101*(9), 1054–1064. https://doi.org/10.3324/haematol.2015.132589

Gotoh, A., Takahira, H., Mantel, C., Litz-Jackson, S., Boswell, H. S., & Broxmeyer, H. E. (1996). Steel factor induces serine phosphorylation of Stat3 in human growth factor-dependent myeloid cell lines. *Blood*, *88*(1), 138–145.

Göttgens, B., Nastos, A., Kinston, S., Piltz, S., Delabesse, E. C. M., Stanley, M., … Green, A. R. (2002). Establishing the transcriptional programme for blood: The SCL stem cell enhancer is regulated by a multiprotein complex containing Ets and GATA factors. *EMBO Journal*, *21*(12), 3039–3050. https://doi.org/10.1093/emboj/cdf286

Gouilleux, F., Pallard, C., Dusanter-Fourt, I., Wakao, H., Haldosen, L. A., Norstedt, G., … Groner, B. (1995). Prolactin, growth hormone, erythropoietin and granulocyte-macrophage colony stimulating factor induce MGF-Stat5 DNA binding activity. *The EMBO Journal*, *14*(9), 2005–2013. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07192.x

Grabher, C., & Payne, E. M. (2010). Zebrafish microRNA-126 determines hematopoietic cell fate through c-Myb. *Leukemia*, *25*(3), 506–514. https://doi.org/10.1038/leu.2010.280

Gregoli, B. P. A., & Bondurant, M. C. (1997). *the Roles of Bcl-XL and Apopain in the Control of Erythropoiesis by Erythropoietin*.

Gregory, B. R. C., Taxman, D. J., Seshasayee, D., Kensinger, M. H., Bieker, J. J., & Wojchowski, D. M. (1996). *Functional Interaction of GATAl With Erythroid Kruppel-Like Factor and SP1 at Defined Erythroid Promoters*. 1793–1802.

Gregory, J., & Eaves, C. (1978). *which they based*. *3*.

Gregory, L. A., Aguissa-Touré, A. H., Pinaud, N., Legrand, P., Gleizes, P. E., & Fribourg, S. (2007). Molecular basis of Diamond-Blackfan anemia: Structure and function analysis of RPS19. *Nucleic Acids Research*, *35*(17), 5913–5921. https://doi.org/10.1093/nar/gkm626

Gregory, T., Yu, C., Ma, A., Orkin, S. H., Blobel, G. A., & Weiss, M. J. (1999). GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-x(L) expression. *Blood*, *94*(1), 87–96.

Griffin, J. N., Sondalle, S. B., Robson, A., Mis, E. K., Griffin, G., Kulkarni, S. S., … Khokha, M. K. (2018). RPSA, a candidate gene for isolated congenital asplenia, is required for pre-rRNA processing and spleen formation in Xenopus. *Development (Cambridge, England)*. https://doi.org/10.1242/dev.166181

Grillot, D. A. M., González-García, M., Ekhterae, D., Duan, L., Inohara, N., Núñez, G., … Seldin, M. F. (1997). Genomic Organization, Promoter Region Analysis, and Chromosome Localization of the Mouse bcl-x Gene. *Journal of Immunology*, *158*(10), 4750–4757.

Gripp, K. W., Curry, C., Olney, A. H., Sandoval, C., Fisher, J., Chong, J. X.-L., … Sol-Church, K. (2014). Diamond-Blackfan anemia with mandibulofacial dystostosis is heterogeneous, including the novel DBA genes TSR2 and RPS28. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *164*(9), 2240–2249. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36633

Guibentif, C., Rönn, R. E., Böiers, C., Lang, S., Saxena, S., Soneji, S., … Woods, N. B. (2017).

Single-Cell Analysis Identifies Distinct Stages of Human Endothelial-to-Hematopoietic Transition. *Cell Reports*, *19*(1), 10–19. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.023

Gupta, S., Campbell, D., Dérijard, B., & Davis, R. J. (1995). Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science*, *267*(5196), 389–393. https://doi.org/10.1126/science.7824938

Gurevitch, O., Slavin, S., & Feldman, A. G. (2007). Conversion of red bone marrow into yellow - Cause and mechanisms. *Medical Hypotheses*, *69*(3), 531–536. https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.01.052

Haase, V. H. (2013). Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Reviews*, *27*(1), 41–53. https://doi.org/10.1016/j.blre.2012.12.003

Hafid-medheb, K., Augery-bourget, Y., Minatchy, M., Hanania, N., & Robert-le, J. (2003). *Bcl-X L is required for heme synthesis during the chemical induction of erythroid differentiation of murine erythroleukemia cells independently of its antiapoptotic function*. *101*(7), 2575–2583. https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0478.Supported

Halupa, A., Bailey, M. L., Huang, K., Iscove, N. N., Levy, D. E., & Barber, D. L. (2005). A novel role for STAT1 in regulating murine erythropoiesis: Deletion of STAT1 results in overall reduction of erythroid progenitors and alters their distribution. *Blood*, *105*(2), 552–561. https://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3237

Han, Y. L., Hou, C. C., Du, C., & Zhu, J. Q. (2017). Molecular cloning and expression analysis of five heat shock protein 70 (HSP70) family members in Lateolabrax maculatus with Vibrio harveyi infection. *Fish and Shellfish Immunology*, *60*, 299–310. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.056

Hanley, M. B., Napolitano, L. A., & McCune, J. M. (2005). Growth Hormone-Induced Stimulation of Multilineage Human Hematopoiesis. *Stem Cells*, *23*(8), 1170–1179. https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0322

Hanspal, M., & Hanspal, J. S. (1994). The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: A 30-kD heparin-binding protein is involved in this contact. *Blood*, *84*(10), 3494–3504.

Hanspal, M., Smockova, Y., & Uong, Q. (1998). Molecular identification and functional characterization of a novel protein that mediates the attachment of erythroblasts to macrophages. *Blood*.

Hasegawa, A., Kaneko, H., Ishihara, D., Nakamura, M., Watanabe, A., Yamamoto, M., … Shimizu, R. (2016). GATA1 Binding Kinetics on Conformation-Specific Binding Sites Elicit Differential Transcriptional Regulation. *Molecular and Cellular Biology*, *36*(16), 2151–2167. https://doi.org/10.1128/mcb.00017-16

Hashem, H., Kumar, A. R., Müller, I., Babor, F., Bredius, R., Dalal, J., … Meyts, I. (2017). Hematopoietic stem cell transplantation rescues the hematological, immunological, and vascular phenotype in DADA2. *Blood*. https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-798660

Haskó, G., Linden, J., Cronstein, B., & Pacher, P. (2008). Adenosine receptors: Therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*. https://doi.org/10.1038/nrd2638

He, L., Hannon, G. J., & Harbor, C. S. (2004). *MicroRNAs : SMALL RNAs WITH A BIG ROLE IN GENE REGULATION*. *5*(July). https://doi.org/10.1038/nrg1379

He, W., Dorn, D. C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Moore, M. A. S., & Massagué, J. (2006). Hematopoiesis Controlled by Distinct TIF1γ and Smad4 Branches of the TGFβ Pathway. *Cell*, *125*(5), 929–941. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.045

Heijnen, H. F., van Wijk, R., Pereboom, T. C., Goos, Y. J., Seinen, C. W., van Oirschot, B. A., … MacInnes, A. W. (2014). Ribosomal Protein Mutations Induce Autophagy through S6 Kinase Inhibition of the Insulin Pathway. *PLoS Genetics*, *10*(5). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004371

Henderson, A. S., Warburton, D., & Atwood, K. C. (1972). Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *69*(11), 3394–3398. https://doi.org/10.1073/pnas.69.11.3394

Hendler, E. D., Goffinet, J. A., Ross, S., Longnecker, R. E., & Bakovic, V. (1974). Controlled Study of Androgen Therapy in Anemia of Patients on Maintenance Hemodialysis. *New England Journal of Medicine*, *291*(20), 1046–1051. https://doi.org/10.1056/NEJM197411142912002

Henras, A. K., Soudet, J., Gérus, M., Lebaron, S., Caizergues-Ferrer, M., Mougin, A., & Henry, Y. (2008). The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *65*(15), 2334–2359. https://doi.org/10.1007/s00018-008-8027-0

Henras, Anthony K., Plisson-Chastang, C., Humbert, O., Romeo, Y., & Henry, Y. (2017). Synthesis, Function, and Heterogeneity of snoRNA-Guided Posttranscriptional Nucleoside Modifications in Eukaryotic Ribosomal RNAs. *Enzymes*, *41*, 169–213. https://doi.org/10.1016/bs.enz.2017.03.007

Henras, Anthony K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M. F., Chakraborty, A., & Gleizes, P. E. (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, *6*(2), 225–242. https://doi.org/10.1002/wrna.1269

Herbst, R., Lammers, R., Schlessinger, J., & Ullrich, A. (1991). Substrate phosphorylation specificity of the human c-kit receptor tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(30), 19908–19916.

Hernandez-Verdun, D., Roussel, P., Thiry, M., Sirri, V., & Lafontaine, D. L. J. (2010). The nucleolus: Structure/function relationship in RNA metabolism. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, *1*(3), 415–431. https://doi.org/10.1002/wrna.39

Hietakangas, V., Poukkula, M., Heiskanen, K. M., Karvinen, J. T., Sistonen, L., Eriksson, J. E., … Turku, F.-. (2003). *Erythroid Differentiation Sensitizes K562 Leukemia Cells to TRAIL-Induced Apoptosis by Downregulation of c-FLIP*. *23*(4), 1278–1291. https://doi.org/10.1128/MCB.23.4.1278

Ho, J. H. N., Kallstrom, G., & Johnson, A. W. (2000). Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *Journal of Cell Biology*, *151*(5), 1057–1066. https://doi.org/10.1083/jcb.151.5.1057

Hogan, C., Hutchison, C., Marcar, L., Milne, D., Saville, M., Goodlad, J., … Meek, D. (2008). Elevated levels of oncogenic protein kinase Pim-1 induce the p53 pathway in cultured cells and correlate with increased Mdm2 in mantle cell lymphoma. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(26), 18012–18023. https://doi.org/10.1074/jbc.M709695200

Hollanda, L. M., Lima, C. S. P., Cunha, A. F., Albuquerque, D. M., Vassallo, J., Ozelo, M. C., … Costa, F. F. (2006). An inherited mutation leading to production of only the short isoform of GATA-1 is associated with impaired erythropoiesis. *Nature Genetics*, *38*(7), 807–812. https://doi.org/10.1038/ng1825

Honda, S., Arakawa, S., Nishida, Y., Yamaguchi, H., Ishii, E., & Shimizu, S. (2014). Ulk1-mediated Atg5-independent macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes. *Nature Communications*, *5*, 1–13. https://doi.org/10.1038/ncomms5004

Hooghe, R., Delhase, M., Vergani, P., Malur, A., & Plooghe-Peters, E. L. (1993). Growth hormone and prolactin are paracrine growth and differentiation factors in the haemopoietic system. *Immunology Today*, *14*(5), 212–214. https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90165-H

Horos, R., IJspeert, H., Pospisilova, D., Sendtner, R., Andrieu-Soler, C., Taskesen, E., … Von Lindern, M. (2012). Ribosomal deficiencies in Diamond-Blackfan anemia impair translation of transcripts essential for differentiation of murine and human erythroblasts. *Blood*, *119*(1), 262–272. https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-358200

Hsu, Y. R., Wu, G. M., Mendiaz, E. A., Syed, R., Wypych, J., Toso, R., … Langley, K. E. (1997). The majority of stem cell factor exists as monomer under physiological conditions. Implications for dimerization mediating biological activity. *Journal of Biological Chemistry*. https://doi.org/10.1074/jbc.272.10.6406

Hu, J., Liu, J., Xue, F., Halverson, G., Reid, M., Guo, A., … An, X. (2013). Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. *Blood*, *121*(16), 3246–3253. https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-476390

Hu, Z. B., Minden, M. D., & McCulloch, E. A. (2000). Regulation of drag sensitivity by ribosomal protein S3a. *Blood*.

Huang, E., Nocka, K., Beier, D. R., Chu, T. Y., Buck, J., Lahm, H. W., … Besmer, P. (1990). The hematopoietic growth factor KL is encoded by the SI locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell*, *63*(1), 225–233. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90303-V

Huang, L. J. shen, Constantinescu, S. N., & Lodish, H. F. (2001). The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Molecular Cell*, *8*(6), 1327–1338. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00401-4

Huang, P., Gautschi, M., Walter, W., Rospert, S., & Craig, E. A. (2005). The Hsp70 Ssz1 modulates the function of the ribosome-associated J-protein Zuo1. *Nature Structural and Molecular Biology*, *12*(6), 497–504. https://doi.org/10.1038/nsmb942

Huang, S., Chen, Z., Yu, J. F., Young, D., Bashey, A., Ho, A. D., & Law, P. (1999). Correlation between IL-3 receptor expression and growth potential of human CD34+ hematopoietic cells from different tissues. *Stem Cells*, *17*(5), 265–272. https://doi.org/10.1002/stem.170265

Hubbard, S. R. (2004). Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *5*(6), 464–470. https://doi.org/10.1038/nrm1399

Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs : contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Publishing Group*, *12*(2), 99–110. https://doi.org/10.1038/nrg2936

Hunziker, M., Barandun, J., Buzovetsky, O., Steckler, C., Molina, H., & Klinge, S. (2019). Conformational switches control early maturation of the eukaryotic small ribosomal subunit. *ELife*, *8*, 1–16. https://doi.org/10.7554/eLife.45185

Iavarone, A., King, E. R., Dai, X. M., Leone, G., Stanley, E. R., & Lasorella, A. (2004). Retinoblastoma promotes definitive erythropoiesis by repressing Id2 in fetal liver macrophages. *Nature*, *432*(7020), 1040–1045. https://doi.org/10.1038/nature03068

Iguchi, T., Sogo, S., Hisha, H., Taketani, S., Adachi, Y., Miyazaki, R., … Ikehara, S. (1999). HGF Activates Signal Transduction from EPO Receptor on Human Cord Blood CD34 + /CD45 + Cells. *Stem Cells*, *17*(2), 82–91. https://doi.org/10.1002/stem.170082

Iii, R. W. G., Hildreth, R., Morisot, S., Alder, J., Liu, C., Heimfeld, S., … Civin, C. I. (2007). *microRNA expression and function : A circuit diagram of differentiation control*.

Iijima, R., Kunieda, T., Yamaguchi, S., Kamigaki, H., Fujii-Taira, I., Sekimizu, K., … Homma, K. J. (2008). The extracellular adenosine deaminase growth factor, ADGF/CECR1, plays a role in Xenopus embryogenesis via the adenosine/P1 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(4), 2255–2264. https://doi.org/10.1074/jbc.M709279200

Ingley, E., McCarthy, D. J., Pore, J. R., Sarna, M. K., Adenan, A. S., Wright, M. J., … Klinken, S. P. (2005). Lyn deficiency reduces GATA-1, EKLF and STAT5, and induces extramedullary stress erythropoiesis. *Oncogene*, *24*(3), 336–343. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208199

Inoue, A., Fujiwara, T., Okitsu, Y., Katsuoka, Y., Fukuhara, N., Onishi, Y., … Harigae, H. (2013). Elucidation of the role of LMO2 in human erythroid cells. *Experimental Hematology*, *41*(12), 1062-1076.e1. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2013.09.003

Iouk, T. L., Aitchison, J. D., Maguire, S., & Wozniak, R. W. (2001). Rrb1p, a Yeast Nuclear WD-Repeat Protein Involved in the Regulation of Ribosome Biosynthesis. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(4), 1260–1271. https://doi.org/10.1128/mcb.21.4.1260-1271.2001

Iscove, N. N. (1977). THE ROLE OF ERYTHROPOIETIN IN REGULATION OF POPULATION SIZE AND CELL CYCLING OF EARLY AND LATE ERYTHROID PRECURSORS IN MOUSE BONE MARROW. *Cell Proliferation*, *10*(4), 323–334. https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1977.tb00300.x

Iscove, N. N., Sieber, F., & Winterhalter, K. H. (1974). Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow: Analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-concanavalin A. *Journal of Cellular Physiology*, *83*(2), 309–320. https://doi.org/10.1002/jcp.1040830218

Jaako, P., Flygare, J., Olsson, K., Quere, R., Ehinger, M., Henson, A., … Karlsson, S. (2011). Mice with ribosomal protein S19 deficiency develop bone marrow failure and symptoms like patients with diamond-blackfan anemia. *Blood*, *118*(23), 6087–6096. https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-371963

Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*(2), 113–127. https://doi.org/10.1038/nrm2838

Jacobs-Helber, S. M., & Sawyer, S. T. (2004). Jun N-terminal kinase promotes proliferation of immature erythroid cells and erythropoietin-dependent cell lines. *Blood*, *104*(3), 696–703. https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1754

Jacobs-Helbert, S. M., Penta, K., Sun, Z., Lawson, A., & Sawyer, S. T. (1997). Distinct signaling from stem cell factor and erythropoietin in HCD57 cells. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(11), 6850–6853. https://doi.org/10.1074/jbc.272.11.6850

Jäkel, S., Mingot, J.-M., Schwarzmaier, P., Hartmann, E., & Görlich, D. (2002). Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. *The EMBO Journal*, *21*(3), 377–386. https://doi.org/10.1093/emboj/21.3.377

Jelkmann, W. (1998). Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, *18*(8), 555–559. https://doi.org/10.1089/jir.1998.18.555

Ji, P., Jayapal, S. R., & Lodish, H. F. (2008). Enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts requires Rac GTPases and mDia2. *Nature Cell Biology*, *10*(3), 314–321. https://doi.org/10.1038/ncb1693

Ji, P., Yeh, V., Ramirez, T., Murata-Hori, M., & Lodish, H. F. (2010). Histone deacetylase 2 is required for chromatin condensation and subsequent enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts. *Haematologica*, *95*(12), 2013–2021. https://doi.org/10.3324/haematol.2010.029827

Jiang, J., Tian, F., Cai, Y., Qian, X., Costello, C. E., & Ying, W. (2014). Site-specific qualitative and quantitative analysis of the N- and O-glycoforms in recombinant human erythropoietin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *406*(25), 6265–6274. https://doi.org/10.1007/s00216-014-8037-8

Johnson, C. S., Chang, M. J., & Furmanski, P. (1988). In vivo hematopoietic effects of tumor necrosis factor-alpha in normal and erythroleukemic mice: characterization and therapeutic applications. *Blood*, *72*(6), 1875–1883. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3196871

Johnson, R. A., Waddelow, T. A., Caro, J., Oliff, A., & Roodman, G. D. (1989). Chronic exposure to tumor necrosis factor in vivo preferentially inhibits erythropoiesis in nude

mice. *Blood*, *74*(1), 130–138. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2752104

Jones, S. S., D'Andrea, A. D., Haines, L. L., & Wong, G. G. (1990). Human erythropoietin receptor: Cloning, expression, and biologic characterization. *Blood*, *76*(1), 31–35.

Joseph H.W.(1936). Anaemiaofinfancyandearlychildhood Medicine (Baltimore),

Kadri, Z., Maouche-Chretien, L., Rooke, H. M., Orkin, S. H., Romeo, P.-H., Mayeux, P., … Chretien, S. (2005). Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Induced by Erythropoietin Renders the Erythroid Differentiation Factor GATA-1 Competent for TIMP-1 Gene Transactivation. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(17), 7412–7422. https://doi.org/10.1128/mcb.25.17.7412-7422.2005

Kalfa, T. A., Pushkaran, S., Mohandas, N., Hartwig, J. H., Fowler, V. M., Johnson, J. F., … Zheng, Y. (2006). Rac GTPases regulate the morphology and deformability of the erythrocyte cytoskeleton. *Blood*, *108*(12), 3637–3645. https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-005942

Kaljas, Y., Liu, C., Skaldin, M., Wu, C., Zhou, Q., Lu, Y., … Zavialov, A. V. (2017). Human adenosine deaminases ADA1 and ADA2 bind to different subsets of immune cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *74*(3), 555–570. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2357-0

Karunasena, N., Han, T. S., Mallappa, A., Elman, M., Merke, D. P., Ross, R. J. M., & Daniel, E. (2016). *Androgens correlate with increased erythropoiesis in women with congenital adrenal hyperplasi*. https://doi.org/10.1111/cen.13148

Kashii, Y., Uchida, M., Kirito, K., Tanaka, M., Nishijima, K., Toshima, M., … Komatsu, N. (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*(3), 941–949.

Kater, L., Thoms, M., Barrio-Garcia, C., Cheng, J., Ismail, S., Ahmed, Y. L., … Beckmann, R. (2017). Visualizing the Assembly Pathway of Nucleolar Pre-60S Ribosomes. *Cell*. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.039

Kawane, K., Fukuyama, H., Kondoh, G., Takeda, J., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., & Nagata, S. (2001). Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science*, *292*(5521), 1546–1549. https://doi.org/10.1126/science.292.5521.1546

Kazerounian, S., Ciarlini, P. D. S. C., Yuan, D., Ghazvinian, R., Alberich-Jorda, M., Joshi, M., … Gazda, H. T. (2016). Development of soft tissue sarcomas in ribosomal proteins L5 and S24 heterozygous mice. *Journal of Cancer*, *7*(1), 32–36. https://doi.org/10.7150/jca.13292

Kellendonk, C., Tronche, F., Reichardt, H. M., & Schütz, G. (1999). Mutagenesis of the glucocorticoid receptor in mice. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *69*(1–6), 253–259. https://doi.org/10.1016/S0960-0760(99)00041-2

Khajuria, R. K., Munschauer, M., Ulirsch, J. C., Fiorini, C., Ludwig, L. S., McFarland, S. K., … Sankaran, V. G. (2018). Ribosome Levels Selectively Regulate Translation and Lineage Commitment in Human Hematopoiesis. *Cell*, *173*(1), 90-103.e19. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.036

Khanna, N., Reddy, V. G., Tuteja, N., & Singh, N. (2000). Differential gene expression in apoptosis: Identification of ribosomal protein S29 as an apoptotic inducer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3688

Kim, H., Whartenby, K. A., Georgantas, R. W., Wingard, J., & Civin, C. I. (2002). *Human CD34+ Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Express High Levels of FLIP and Are Resistant to Fas-Mediated Apoptosis*. 174–182.

Kim, A. R., Ulirsch, J. C., Wilmes, S., Unal, E., Moraga, I., Karakukcu, M., … Sankaran, V. G. (2017). Functional Selectivity in Cytokine Signaling Revealed Through a Pathogenic EPO Mutation. *Cell*, *168*(6), 1053-1064.e15. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.026

Kim, E. J., Kho, J. H., Kang, M. R., & Um, S. J. (2007). Active Regulator of SIRT1 Cooperates with SIRT1 and Facilitates Suppression of p53 Activity. *Molecular Cell*, *28*(2), 277–290. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.08.030

Kim, J., Chubatsu, L. S., Admon, A., Stahl, J., Fellous, R., & Linn, S. (1995). Implication of mammalian ribosomal protein S3 in the processing of DNA damage. *Journal of Biological Chemistry*. https://doi.org/10.1074/jbc.270.23.13620

Kirkegaard, T., Roth, A. G., Petersen, N. H. T., Mahalka, A. K., Olsen, O. D., Moilanen, I., … Jäättelä, M. (2010). Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology. *Nature*, *463*(7280), 549–553. https://doi.org/10.1038/nature08710

Klar, J., Khalfallah, A., Arzoo, P. S., Gazda, H. T., & Dahl, N. (2014). Recurrent GATA1 mutations in Diamond-Blackfan anaemia. *British Journal of Haematology*. https://doi.org/10.1111/bjh.12919

Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., & Ban, N. (2012). Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends in Biochemical Sciences*, *37*(5), 189–198. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.02.007

Klinge, S., & Woolford, J. L. (2019). Ribosome assembly coming into focus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(2), 116–131. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0078-y

Klingmüller, U. (1997). The role of tyrosine phosphorylation in proliferation and maturation of erythroid progenitor cells. Signals emanating from the erythropoietin receptor. *European Journal of Biochemistry*, *249*(3), 637–647. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00637.x

Klingmüller, U., Lorenz, U., Cantley, L. C., Neel, B. G., & Lodish, H. F. (1995). Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell*, *80*(5), 729–738. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90351-8

Koch, B., Mitterer, V., Niederhauser, J., Stanborough, T., Murat, G., Rechberger, G., … Pertschy, B. (2012). Yar1 protects the ribosomal protein rps3 from aggregation. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(26), 21806–21815. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.365791

Kohn, L. A., Hao, Q. L., Sasidharan, R., Parekh, C., Ge, S., Zhu, Y., … Crooks, G. M. (2012). Lymphoid priming in human bone marrow begins before expression of CD10 with upregulation of L-selectin. *Nature Immunology*, *13*(10), 963–971. https://doi.org/10.1038/ni.2405

Kolbus, A., Pilat, S., Husak, Z., Deiner, E. M., Stengl, G., Beug, H., & Baccarini, M. (2002). Raf-1 antagonizes erythroid differentiation by restraining caspase activation. *Journal of Experimental Medicine*, *196*(10), 1347–1353. https://doi.org/10.1084/jem.20020562

Kondo, M., Weissman, I. L., & Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*, *91*(5), 661–672. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80453-5

Kondoh, N., Schweinfest, C. W., Henderson, K. W., & Papas, T. S. (1992). Differential Expression of S19 Ribosomal Protein, Laminin-binding Protein, and Human Lymphocyte Antigen Class I Messenger RNAs Associated with Colon Carcinoma Progression and Differentiation. *Cancer Research*.

Kongsuwan, K., Yu, Q., Vincent, A., Frisardi, M. C., Rosbash, M., Lengyel, J. A., & Merriam, J. (1985). A Drosophila Minute gene encodes a ribosomal protein. *Nature*, *317*(6037), 555–558. https://doi.org/10.1038/317555a0

Konstantinidis, D. G., Pushkaran, S., Johnson, J. F., Cancelas, J. A., Manganaris, S., Harris, C. E., … Kalfa, T. A. (2012). Signaling and cytoskeletal requirements in erythroblast enucleation. *Blood*, *119*(25), 6118–6127. https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-379263

Koplin, A., Preissler, S., Llina, Y., Koch, M., Scior, A., Erhardt, M., & Deuerling, E. (2010). A dual function for chaperones SSB-RAC and the NAC nascent polypeptide-associated complex on ribosomes. *Journal of Cell Biology*, *189*(1), 57–68. https://doi.org/10.1083/jcb.200910074

Kopp, H., Avecilla, S. T., Hooper, A. T., & Rafii, S. (2005). The Bone Marrow Vascular Niche : Home of HSC Differentiation and Mobilization Anatomy of the Bone Marrow The Stem Cell Niche Model : *Physiology*, *20*, 349–356.

Kosaka, N., Sugiura, K., Yamamoto, Y., Miyazaki, H., & Ochiya, T. (2008). *Identification of erythropoietin-induced microRNAs in haematopoietic cells during erythroid differentiation*. (May), 293–300. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07151.x

Koury, M., & Bondurant, M. (1990). Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science*, *248*(4953), 378–381. https://doi.org/10.1126/science.2326648

Koury, M. J., & Haase, V. H. (2015). Anaemia in kidney disease: Harnessing hypoxia responses for therapy. *Nature Reviews Nephrology*, *11*(7), 394–410. https://doi.org/10.1038/nrneph.2015.82

Koury, M. J., Koury, S. T., Kopsombut, P., & Bondurant, M. C. (2005). In vitro maturation of nascent reticulocytes to erythrocytes. *Blood*, *105*(5), 2168–2174. https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0616

Koury, M. J., & Ponka, P. (2004). NEW INSIGHTS INTO ERYTHROPOIESIS: The Roles of Folate, Vitamin B 12 , and Iron . *Annual Review of Nutrition*, *24*(1), 105–131. https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132306

Koury, S. T., Bondurant, M. C., Koury, M. J., & Semenza, G. L. (1991). Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood*, *77*(11), 2497–2503.

Koury, S. T., Koury, M. J., & Bondurant, M. C. (1989). Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts. *Journal of Cell Biology*, *109*(6 I), 3005–3013. https://doi.org/10.1083/jcb.109.6.3005

Kozlowski, M., Larose, L., Lee, F., Le, D. M., Rottapel, R., & Siminovitch, K. A. (1998). SHP-1 Binds and Negatively Modulates the c-Kit Receptor by Interaction with Tyrosine 569 in the c-Kit Juxtamembrane Domain. *Molecular and Cellular Biology*, *18*(4), 2089–2099. https://doi.org/10.1128/mcb.18.4.2089

Kressler, D., Bange, G., Ogawa, Y., Stjepanovic, G., Bradatsch, B., Pratte, D., … Hurt, E. (2012). Synchronizing nuclear import of ribosomal proteins with ribosome assembly. *Science*, *338*(6107), 666–671. https://doi.org/10.1126/science.1226960

Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Publishing Group*, *11*(9), 597–610. https://doi.org/10.1038/nrg2843

Kundu, M. (2011). ULK1, mammalian target of rapamycin, and mitochondria: Linking nutrient availability and autophagy. *Antioxidants and Redox Signaling*, *14*(10), 1953–1958. https://doi.org/10.1089/ars.2010.3809

Kundu, M., Lindsten, T., Yang, C. Y., Wu, J., Zhao, F., Zhang, J., … Thompson, C. B. (2008). Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood*, *112*(4), 1493–1502. https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-137398

Kuramitsu, M., Sato-Otsubo, A., Morio, T., Takagi, M., Toki, T., Terui, K., … Hamaguchi, I. (2012). Extensive gene deletions in Japanese patients with diamond-blackfan anemia. *Blood*, *119*(10), 2376–2384. https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-368662

Kurtz, A., Zapf, J., Eckardt, K. U., Clemons, G., Froesch, E. R., & Bauer, C. (1988). Insulin-like growth factor I stimulates erythropoiesis in hypophysectomized rats. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America, *85*(20), 7825–7829. https://doi.org/10.1073/pnas.85.20.7825

Lacombe, C., & Mayeux, P. (1998). Biology of erythropoietin. *Haematologica*, *83*(8), 724–732. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9793257

Lahlil, R., Lecuyer, E., Herblot, S., & Hoang, T. (2004). SCL Assembles a Multifactorial Complex That Determines Glycophorin A Expression. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(4), 1439–1452. https://doi.org/10.1128/mcb.24.4.1439-1452.2004

Lai, X., Liao, J., Lin, W., Huang, C., Li, J., Lin, J., … Ye, Y. (2014). Inhibitor of DNA-binding protein 1 knockdown arrests the growth of colorectal cancer cells and suppresses hepatic metastasis in vivo. *Oncology Reports*, *32*(1), 79–88. https://doi.org/10.3892/or.2014.3172

Lambertsson, A. (1998). 3 The Minute Genes in Drosophila and Their Molecular Functions. *Advances in Genetics*. https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60142-X

Landau, D. A., Tausch, E., Taylor-Weiner, A. N., Stewart, C., Reiter, J. G., Bahlo, J., … Wu, C. J. (2015). Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*. https://doi.org/10.1038/nature15395

Landowski, M., O'Donohue, M. F., Buros, C., Ghazvinian, R., Montel-Lehry, N., Vlachos, A., … Gazda, H. T. (2013). Novel deletion of RPL15 identified by array-comparative genomic hybridization in Diamond-Blackfan anemia. *Human Genetics*, *132*(11), 1265–1274. https://doi.org/10.1007/s00439-013-1326-z

Langley, K. E., Bennett, L. G., Wypych, J., Yancik, S. A., Liu, X. D., Westcott, K. R., … Zsebo, K. M. (1993). Soluble stem cell factor in human serum. *Blood*.

Larsson, J., & Karlsson, S. (2005). The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene*, *24*(37), 5676–5692. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208920

Laurent, B., Randrianarison-Huetz, V., Kadri, Z., Roméo, P. H., Porteu, F., & Duménil, D. (2009). Gfi-1B promoter remains associated with active chromatin marks throughout erythroid differentiation of human primary progenitor cells. *Stem Cells*, *27*(9), 2153–2162. https://doi.org/10.1002/stem.151

Lebaron, S., Segerstolpe, Å., French, S. L., Dudnakova, T., de lima Alves, F., Granneman, S., … Tollervey, D. (2013). Rrp5 binding at multiple sites coordinates Pre-rRNA processing and assembly. *Molecular Cell*, *52*(5), 707–719. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.017

Leberbauer, C., Boulmé, F., Unfried, G., Huber, J., Beug, H., & Müllner, E. W. (2005). Different steroids co-regulate long-term expansion versus terminal differentiation in primary human erythroid progenitors. *Blood*, *105*(1), 85–94. https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1002

Lecoq-Lafon, C., Verdier, F., Fichelson, S., Chrétien, S., Gisselbrecht, S., Lacombe, C., & Mayeux, P. (1999). Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of GAB1 and its association with SHC, SHP2, SHIP, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Blood*, *93*(8), 2578–2585.

Lee, C. S., Bishop, E. S., Zhang, R., Yu, X., Farina, E. M., Yan, S., … He, T. C. (2017). Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes and Diseases*, *4*(2), 43–63. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.04.001

Lee, G., Lo, A., Short, S. A., Mankelow, T. J., Spring, F., Parsons, S. F., … Chasis, J. A. (2006). Targeted gene deletion demonstrates that the cell adhesion molecule ICAM-4 is critical for erythroblastic island formation. *Blood*, *108*(6), 2064–2071. https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-006759

Lee, H.-Y., Gao, X., Barrasa, M. I., Li, H., Elmes, R. R., Peters, L. L., & Lodish, H. F. (2015). PPAR-α and glucocorticoid receptor synergize to promote erythroid progenitor self-renewal. *Nature*, *522*(7557), 474–477. https://doi.org/10.1038/nature14326

Lee, P. J., Jiang, B. H., Chin, B. Y., Iyer, N. V., Alam, J., Semenza, G. L., & Choi, A. M. K. (1997). Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(9), 5375–5381. https://doi.org/10.1074/jbc.272.9.5375

Lee, P. Y. (2018). Vasculopathy, Immunodeficiency, and Bone Marrow Failure: The Intriguing Syndrome Caused by Deficiency of Adenosine Deaminase 2. *Frontiers in Pediatrics*, *6*(October), 1–8. https://doi.org/10.3389/fped.2018.00282

Lee, T. S., & Chau, L. Y. (2002). Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nature Medicine*, *8*(3), 240–246. https://doi.org/10.1038/nm0302-240

Léger-Silvestre, I., Caffrey, J. M., Dawaliby, R., Alvarez-Arias, D. A., Gas, N., Bertolone, S. J., … Ellis, S. R. (2005). Specific role for yeast homologs of the diamond blackfan anemia-associated Rps19 protein in ribosome synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(46), 38177–38185. https://doi.org/10.1074/jbc.M506916200

Leidig, C., Bange, G., Kopp, J., Amlacher, S., Aravind, A., Wickles, S., … Sinning, I. (2013). Structural characterization of a eukaryotic chaperone-the ribosome-associated complex. *Nature Structural and Molecular Biology*, *20*(1), 23–28. https://doi.org/10.1038/nsmb.2447

Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, *141*(7), 1117–1134. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011

Leonard, C., Conrard, L., Guthmann, M., Pollet, H., Carquin, M., Vermylen, C., … Tyteca, D. (2017). Contribution of plasma membrane lipid domains to red blood cell (re)shaping. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–17. https://doi.org/10.1038/s41598-017-04388-z

Letting, D. L., Chen, Y. Y., Rakowski, C., Reedy, S., & Blobel, G. A. (2004). Context-dependent regulation of GATA-1 by friend of GATA-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(2), 476–481. https://doi.org/10.1073/pnas.0306315101

Leu, J. I.-J., Pimkina, J., Frank, A., Murphy, M. E., & George, D. L. (2009). A Small Molecule Inhibitor of Inducible Heat Shock Protein 70. *Molecular Cell*, *36*(1), 15–27. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.023

Leung, C. G., Xu, Y., Mularski, B., Liu, H., Gurbuxani, S., & Crispino, J. D. (2007). Requirements for survivin in terminal differentiation of erythroid cells and maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells. *Journal of Experimental Medicine*, *204*(7), 1603–1611. https://doi.org/10.1084/jem.20062395

Li, G. C., & Werb, Z. (1982). Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *79*(10), 3218–3222. https://doi.org/10.1073/pnas.79.10.3218

Li, J., Hale, J., Bhagia, P., Xue, F., Chen, L., Jaffray, J., … An, X. (2014). Regular Article Isolation and transcriptome analyses of human erythroid progenitors : *Blood*, *124*(24), 3636–3646. https://doi.org/10.1182/blood-2014-07-588806.J.L.

Li, W., Wang, Y., Zhao, H., Zhang, H., Xu, Y., Wang, S., … An, X. (2019). Identification and transcriptome analysis of erythroblastic island macrophages. *Blood*, *134*(5), 480–491. https://doi.org/10.1182/blood.2019000430

Linden, J., & Cekic, C. (2012). Regulation of lymphocyte function by adenosine. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.226837

Ling, K. W., Ottersbach, K., Van Hamburg, J. P., Oziemlak, A., Tsai, F. Y., Orkin, S. H., … Dzierzak, E. (2004). GATA-2 plays two functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells. *Journal of Experimental Medicine*, *200*(7), 871–882.

https://doi.org/10.1084/jem.20031556

Ling, M., He, H., & Mcniece, I. (2007). *MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis*. *35*, 551–564. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.12.002

Ling, T., Crispino, J. D., Zingariello, M., Martelli, F., Rita, A., Biomedico, C., & Sciences, N. (2018). *HHS Public Access*. *11*(3), 169–184. https://doi.org/10.1080/17474086.2018.1436965.GATA1

Lingbo Zhang1, 2, 3, Lina Prak1, Violeta Rayon-Estrada1, 6, Prathapan Thiru1, J., & Flygare1, 5, Bing Lim2, 3, 4, and Harvey F. Lodish1, 2. (2014). *Zfp36l2 is required for self-renewal of early erythroid BFU-E progenitors*. *499*(7456), 92–96. https://doi.org/10.1038/nature12215.Zfp36l2

Linnekin, D., Evans, G. A., D'Andrea, A., & Farrar, W. L. (1992). Association of the erythropoietin receptor with protein tyrosine kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(14), 6237–6241. https://doi.org/10.1073/pnas.89.14.6237

Lipton, J. M., Atsidaftos, E., Zyskind, I., & Vlachos, A. (2006). Improving clinical care and elucidating the pathophysiology of Diamond Blackfan anemia: An update from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Pediatric Blood & Cancer*, *46*(5), 558–564. https://doi.org/10.1002/pbc.20642

Lipton, J. M., & Ellis, S. R. (2009). Diamond-Blackfan Anemia: Diagnosis, Treatment, and Molecular Pathogenesis. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *23*(2), 261–282. https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.01.004

Lipton, J. M., Federman, N., Khabbaze, Y., Schwartz, C. L., Hilliard, L. M., Clark, J. I., & Vlachos, A. (2001). Osteogenic sarcoma associated with diamond-blackfan anemia: A report from the diamond-blackfan anemia registry. *American Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, *23*(1), 39–44. https://doi.org/10.1097/00043426-200101000-00009

Liu, J. J., Hou, S. C., & Shen, C. K. J. (2003). Erythroid gene suppression by NF-κB. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(21), 19534–19540. https://doi.org/10.1074/jbc.M212278200

Liu, J. M., & Ellis, S. R. (2006). Ribosomes and marrow failure: Coincidental association or molecular paradigm? *Blood*, *107*(12), 4583–4588. https://doi.org/10.1182/blood-2005-12-4831

Livnah, O., Stura, E. A., Johnson, D. L., Middleton, S. A., Mulcahy, L. S., Wrighton, N. C., … Wilson, I. A. (1996). Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: The EPO receptor complex at 2.8 Å. *Science*, *273*(5274), 464–471. https://doi.org/10.1126/science.273.5274.464

Love, P. E., Warzecha, C., & Li, L. Q. (2014, January). Ldb1 complexes: The new master regulators of erythroid gene transcription. *Trends in Genetics*, Vol. 30, pp. 1–9. https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.10.001

Lu, J., Sun, M., & Ye, K. (2013). Structural and functional analysis of Utp23, a yeast ribosome synthesis factor with degenerate PIN domain. *Rna*, *19*(12), 1815–1824. https://doi.org/10.1261/rna.040808.113

Lu, L., Heinrich, M. C., Wang, L. S., Dai, M. S., Zigler, A. J., Chai, L., & Broxmeyer, H. E. (1999). Retroviral-mediated gene transduction of c-kit into single hematopoietic progenitor cells from cord blood enhances erythroid colony formation and decreases sensitivity to inhibition by tumor necrosis factor-α and transforming growth factor-β1. *Blood*, *94*(7), 2319–2332.

Ludwig, L. S., Gazda, H. T., Eng, J. C., Eichhorn, S. W., Thiru, P., Ghazvinian, R., … Sankaran, V. G. (2014). Altered translation of GATA1 in Diamond-Blackfan anemia. *Nature Medicine*, *20*(7), 748–753. https://doi.org/10.1038/nm.3557

Lui, J. C., & Kong, S. (2006). *Erythropoietin activates caspase-3 and downregulates CAD during erythroid differentiation in TF-1 cells – A protection mechanism against DNA fragmentation*. *580*, 1965–1970. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.02.059

Lulli, V., Morsilli, O., Cianciulli, P., Gabbianelli, M., Testa, U., Giuliani, A., & Marziali, G. (2013). *MicroRNA-486-3p Regulates c -Globin Expression in Human Erythroid Cells by Directly Modulating BCL11A*. *8*(4), 1–12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060436

Lupo, F., Tibaldi, E., Matte, A., Sharma, A. K., Brunati, A. M., Alper, S. L., … De Franceschi, L. (2016). A new molecular link between defective autophagy and erythroid abnormalities in chorea-acanthocytosis. *Blood*, *128*(25), 2976–2987. https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-727321

Maggio, M., Snyder, P. J., Ceda, G. P., Milaneschi, Y., & Luci, M. (2013). *Is the haematopoietic effect of testosterone mediated by erythropoietin ? The results of a clinical trial in older men*. https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2012.00009.x

Magor, G. W., Tallack, M. R., Gillinder, K. R., Bell, C. C., McCallum, N., Williams, B., & Perkins, A. C. (2015). KLF1-null neonates display hydrops fetalis and a deranged erythroid transcriptome. *Blood*, *125*(15), 2405–2417. https://doi.org/10.1182/blood-2014-08-590968

Mahata, B., Sundqvist, A., & Xirodimas, D. P. (2012). Recruitment of RPL11 at promoter sites of p53-regulated genes upon nucleolar stress through NEDD8 and in an Mdm2-dependent manner. *Oncogene*, *31*(25), 3060–3071. https://doi.org/10.1038/onc.2011.482

Majeti, R., Park, C. Y., & Weissman, I. L. (2007). Identification of a Hierarchy of Multipotent Hematopoietic Progenitors in Human Cord Blood. *Cell Stem Cell*. https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.10.001

Malik, J., Kim, A. R., Tyre, K. A., Cherukuri, A. R., & Palis, J. (2013). Erythropoietin critically regulates the terminal maturation of murine and human primitive erythroblasts. *Haematologica*, *98*(11), 1778–1787. https://doi.org/10.3324/haematol.2013.087361

Manz, M. G., Miyamoto, T., Akashi, K., & Weissman, I. L. (2002). Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(18), 11872–11877. https://doi.org/10.1073/pnas.172384399

Mao-De, L., & Jing, X. (2007). Ribosomal Proteins and Colorectal Cancer. *Current Genomics*, *8*(1), 43–49. https://doi.org/10.2174/138920207780076938

Maouche, S., Poirier, O., Godefroy, T., Olaso, R., Gut, I., Collet, J. P., … Cambien, F. (2008). Performance comparison of two microarray platforms to assess differential gene expression in human monocyte and macrophage cells. *BMC Genomics*, *9*, 1–13. https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-302

Martin, D. I. K., Tsai, S. F., & Orkin, S. H. (1989). Increased γ-globin expression in a nondeletion HPFH mediated by an erythroid-specific DNA-binding factor. *Nature*, *338*(6214), 435–438. https://doi.org/10.1038/338435a0

Marygold, S. J., Coelho, C. M. A., & Leevers, S. J. (2005). Genetic analysis of RpL38 and RpL5, two minute genes located in the centric heterochromatin of chromosome 2 of Drosophila melanogaster. *Genetics*, *169*(2), 683–695. https://doi.org/10.1534/genetics.104.034124

Masaki, S., Ohtsuka, R., Abe, Y., Muta, K., & Umemura, T. (2007). Expression patterns of microRNAs 155 and 451 during normal human erythropoiesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *364*(3), 509–514. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.077

Masson, K., Heiss, E., Band, H., & Rönnstrand, L. (2006). Direct binding of Cbl to Tyr568 and Tyr936 of the stem cell factor receptor/c-Kit is required for ligand-induced ubiquitination, internalization and degradation. *Biochemical Journal*, *399*(1), 59–67.

https://doi.org/10.1042/BJ20060464
Mastromarino, V., Volpe, M., Musumeci, M. B., Autore, C., & Conti, E. (2011). Erythropoietin and the heart: Facts and perspectives. *Clinical Science*, *120*(2), 51–63. https://doi.org/10.1042/CS20100305
Matherly, L. H., & Goldman, I. D. (2003). Membrane Transport of Folates. *Vitamins and Hormones*, *66*, 403–456. https://doi.org/10.1016/S0083-6729(03)01012-4
Matsson, H., Davey, E. J., Draptchinskaia, N., Hamaguchi, I., Ooka, A., Leveen, P., … Dahl, N. (2004). Targeted Disruption of the Ribosomal Protein S19 Gene Is Lethal Prior to Implantation. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(9), 4032–4037. https://doi.org/10.1128/mcb.24.9.4032-4037.2004
Matsumoto, A., Masuhara, M., Mitsui, K., Yokouchi, M., Ohtsubo, M., Misawa, H., … Yoshimura, A. (1997). CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood*, *89*(9), 3148–3154.
Mattijssen, S., Hinson, E. R., Onnekink, C., Hermanns, P., Zabel, B., Cresswell, P., & Pruijn, G. J. M. (2011). Viperin mRNA is a novel target for the human RNase MRP/RNase P endoribonuclease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *68*(14), 2469–2480. https://doi.org/10.1007/s00018-010-0568-3
Mayer, M. P., & Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *62*(6), 670–684. https://doi.org/10.1007/s00018-004-4464-6
Mazuruk, K., Schoen, T. J., Chader, G. J., Iwata, T., & Rodriguez, I. R. (1996). Structural organization and chromosomal localization of the human ribosomal protein L9 gene. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, *1305*(3), 151–162. https://doi.org/10.1016/0167-4781(95)00201-4
McCaffery, P. J., Fraser, J. K., Lin, F. K., & Berridge, M. V. (1989). Subunit structure of the erythropoietin receptor. *Journal of Biological Chemistry*.
McCranor, B. J., Kim, M. J., Cruz, N. M., Xue, Q. L., Berger, A. E., Walston, J. D., … Roy, C. N. (2014). Interleukin-6 directly impairs the erythroid development of human TF-1 erythroleukemic cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *52*(2–3), 126–133. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2013.09.004
McGowan, K. A., Li, J. Z., Park, C. Y., Beaudry, V., Tabor, H. K., Sabnis, A. J., … Barsh, G. S. (2008). Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects. *Nature Genetics*, *40*(8), 963–970. https://doi.org/10.1038/ng.188
McIver, S. C., Katsumura, K. R., Davids, E., Liu, P., Kang, Y. A., Yang, D., & Bresnick, E. H. (2016). Exosome complex orchestrates developmental signaling to balance proliferation and differentiation during erythropoiesis. *ELife*, *5*(AUGUST), 1–22. https://doi.org/10.7554/eLife.17877
Means, R. T., Dessypris, E. N., & Krantz, S. B. (1992). Inhibition of human erythroid colony-forming units by interleukin-1 is mediated by gamma interferon. *Journal of Cellular Physiology*. https://doi.org/10.1002/jcp.1041500109
Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau De Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2012). One core, two shells: Bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature Structural and Molecular Biology*, *19*(6), 560–567. https://doi.org/10.1038/nsmb.2313
Mendelson, A., & Frenette, P. S. (2014). Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nature Medicine*, *20*(8), 833–846. https://doi.org/10.1038/nm.3647
Merchav, S., Silvian-Drachsler, I., Tatarsky, I., Lake, M., & Skottner, A. (1992). Comparative studies of the erythroid-potentiating effects of biosynthetic human insulin-like growth factors-I and -II. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *74*(2), 447–452. https://doi.org/10.1210/jcem.74.2.1730818

Merchav, S., Tatarsky, I., & Hochberg, Z. (1988). Enhancement of erythropoiesis in vitro by human growth hormone is mediated by insulin-like growth factor I. *British Journal of Haematology*, *70*(3), 267–271. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1988.tb02480.x

Merika, M., & Orkin, S. H. (1995). *Functional Synergy and Physical Interactions of the Erythroid Transcription Factor GATA-1 with the Kru ¨ ppel Family Proteins Sp1 and EKLF*. *15*(5), 2437–2447.

Meyer, L., Deau, B. D., Forejtníková, H., Duménil, D., Margottin-Goguet, F., Lacombe, C., … Verdier, F. (2007). β-Trcp mediates ubiquitination and degradation of the erythropoietin receptor and controls cell proliferation. *Blood*, *109*(12), 5215–5222. https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-055350

Meyts, I., & Aksentijevich, I. (2018). Deficiency of adenosine deaminase 2 (DADA2): Updates on the phenotype, genetics, pathogenesis, and treatment. *Journal of Clinical Immunology*. https://doi.org/10.1007/s10875-018-0525-8

Migliaccio, G., Migliaccio, A., & Visser, J. (1988). Synergism between erythropoietin and interleukin-3 in the induction of hematopoietic stem cell proliferation and erythroid burst colony formation. *Blood*, *72*(3), 944–951. https://doi.org/10.1182/blood.V72.3.944.bloodjournal723944

Miller, B. A., Cheung, J. Y., Tillotson, D. L., Hope, S. M., & Scaduto, R. C. (1989). Erythropoietin stimulates a rise in intracellular-free calcium concentration in single BFU-E derived erythroblasts at specific stages of differentiation. *Blood*, *73*(5), 1188–1194. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2649170

Miller, I. J., & Bieker, J. J. (1993). A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Krüppel family of nuclear proteins. *Molecular and Cellular Biology*, *13*(5), 2776–2786. https://doi.org/10.1128/mcb.13.5.2776

Minegishi, N., Ohta, J., Yamagiwa, H., Suzuki, N., Kawauchi, S., Zhou, Y., … Yamamoto, M. (1999). The Mouse GATA-2 Gene is Expressed in the Para-Aortic Splanchnopleura and Aorta-Gonads and Mesonephros Region. *Blood*, *93*(12), 4196–4207. https://doi.org/10.1182/blood.V93.12.4196.412k23_4196_4207

Mirabello, L., Macari, E. R., Jessop, L., Ellis, S. R., Myers, T., Giri, N., … Savage, S. A. (2014). Whole-exome sequencing and functional studies identify RPS29 as a novel gene mutated in multicase Diamond-Blackfan anemia families. *Blood*, *124*(1), 24–32. https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-540278

Miura, O., D'Andrea, A., Kabat, D., & Ihle, J. N. (1991). Induction of tyrosine phosphorylation by the erythropoietin receptor correlates with mitogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, *11*(10), 4895–4902. https://doi.org/10.1128/mcb.11.10.4895

Miyagawa, S. I., Kobayashi, M., Konishi, N., Sato, T., & 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. *British Journal of Haematology*, *109*(3), 555–562. https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.02047.x

Miyake, T., Kung, C. K. H., & Goldwasser, E. (1977). Purification of human erythropoietin. *Journal of Biological Chemistry*, *252*(15), 5558–5564.

Miyazawa, K., Toyama, K., Gotoh, A., Hendrie, P. C., Mantel, C., & Broxmeyer, H. E. (1994). Ligand-dependent polyubiquitination of c-kit gene product: A possible mechanism of receptor down modulation in M07e cells. *Blood*, *83*(1), 137–145.

Mogk, A., Deuerling, E., Vorderwülbecke, S., Vierling, E., & Bukau, B. (2003). Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Molecular Microbiology*, *50*(2), 585–595. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03710.x

Mohammdai-Asl, J., Ramezani, A., Norozi, F., Malehi, A. S., Asnafi, A. A., Far, M. A. J., …

Saki, N. (2015). MicroRNAs in erythropoiesis and red blood cell disorders. *Frontiers in Biology*, *10*(4), 321–332. https://doi.org/10.1007/s11515-015-1365-z

Mohandas, N., & Chasis, J. A. (2010). The erythroid niche: Molecular processes occurring within erythroblastic islands. *Transfusion Clinique et Biologique*, *17*(3), 110–111. https://doi.org/10.1016/j.tracli.2010.05.009

Mol, C. D., Lim, K. B., Sridhar, V., Zou, H., Chien, E. Y. T., Sang, B. C., … McRee, D. E. (2003). Structure of a c-Kit product complex reveals the basis for kinase transactivation. *Journal of Biological Chemistry*. https://doi.org/10.1074/jbc.C300186200

Moniz, H., Gastou, M., Leblanc, T., Hurtaud, C., Cré Tien, A., Lécluse, Y., … Da Costa, L. (2012). Primary hematopoietic cells from DBA patients with mutations in RPL11 and RPS19 genes exhibit distinct erythroid phenotype in vitro. *Cell Death and Disease*, *3*(7). https://doi.org/10.1038/cddis.2012.88

Morceau, F., Dicato, M., & Diederich, M. (2009). *Regarding Molecular Mechanisms of Erythropoiesis*. *2009*(Il). https://doi.org/10.1155/2009/405016

Morgado-Palacin, L., Varetti, G., Llanos, S., Gómez-López, G., Martinez, D., & Serrano, M. (2015). Partial Loss of Rpl11 in Adult Mice Recapitulates Diamond-Blackfan Anemia and Promotes Lymphomagenesis. *Cell Reports*, *13*(4), 712–722. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.038

Mori, M., Uchida, M., Watanabe, T., Kirito, K., Hatake, K., Ozawa, K., & Komatsu, N. (2003). Activation of extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 induces Bcl-xL up-regulation via inhibition of caspase activities in erythropoietin signaling. *Journal of Cellular Physiology*, *195*(2), 290–297. https://doi.org/10.1002/jcp.10245

Morita, T., & Lindsay, S. (2007). Determination of single molecule conductances of alkanedithiols by conducting-atomic force microscopy with large gold nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. https://doi.org/10.1021/ja072040+

Morrissey, J. P., & Tollervey, D. (1993). Yeast snR30 is a small nucleolar RNA required for 18S rRNA synthesis. *Molecular and Cellular Biology*, *13*(4), 2469–2477. https://doi.org/10.1128/mcb.13.4.2469

Mortensen, M., Ferguson, D. J. P., Edelmann, M., Kessler, B., Morten, K. J., Komatsu, M., & Simon, A. K. (2010). Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(2), 832–837. https://doi.org/10.1073/pnas.0913170107

Motoyama, N., Kimura, T., Takahashi, T., Watanabe, T., & Nakano, T. (1999). bcl-x Prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *Journal of Experimental Medicine*, *189*(11), 1691–1698. https://doi.org/10.1084/jem.189.11.1691

Muench, D. E., Ferchen, K., Velu, C. S., Pradhan, K., Chetal, K., Chen, X., … Grimes, H. L. (2018). SKI controls MDS-associated chronic TGF-β signaling, aberrant splicing, and stem cell fitness. *Blood*, *132*(21), E24–E34. https://doi.org/10.1182/blood-2018-06-860890

Mukhopadhyay, C. K., Mazumder, B., & Fox, P. L. (2000). Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(28), 21048–21054. https://doi.org/10.1074/jbc.M000636200

Müller, A. M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F., & Dzierzakt, E. (1994). Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity*, *1*(4), 291–301. https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90081-7

Müller, J., Hart, C. M., Francis, N. J., Vargas, M. L., Sengupta, A., Wild, B., … Simon, J. A. (2002). Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell*, *111*(2), 197–208. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00976-5

Multhoff, G., Pfister, K., Gehrmann, M., Hantschel, M., Gross, C., Hafner, M., & Hiddemann, W. (2001). A 14-mer Hsp70 peptide stimulates natural killer (NK) cell activity. *Cell Stress and Chaperones*, *6*(4), 337–344. https://doi.org/10.1379/1466-1268(2001)006<0337:AMHPSN>2.0.CO;2

Muta, K., Krantz, S. B., Bondurant, M. C., & Dai, C. H. (1995). Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation. *Blood*, *86*(2), 572–580.

Muta, K., Krantz, S. B., Bondurant, M. C., & Wickrema, A. (1994). Distinct roles of erythropoietin, insulin-like growth factor I, and stem cell factor in the development of erythroid progenitor cells. *Journal of Clinical Investigation*, *94*(1), 34–43. https://doi.org/10.1172/JCI117327

Naets, J., & Wittek, M. (1966). Mechanism of action of androgens on erythropoiesis. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, *210*(2), 315–320. https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1966.210.2.315

Naldini, L. (2015). Gene therapy returns to centre stage. *Nature*, *526*(7573), 351–360. https://doi.org/10.1038/nature15818

Narla, A., Dutt, S., McAuley, J. R., Al-Shahrour, F., Hurst, S., McConkey, M., … Ebert, B. L. (2011). Dexamethasone and lenalidomide have distinct functional effects on erythropoiesis. *Blood*, *118*(8), 2296–2304. https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-318543

Narla, A., & Ebert, B. L. (2010). Ribosomopathies: Human disorders of ribosome dysfunction. *Blood*, *115*(16), 3196–3205. https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-178129

Narla, A., Vlachos, A., & Nathan, D. G. (2011). Diamond Blackfan anemia treatment: Past, present, and future. *Seminars in Hematology*, *48*(2), 117–123. https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2011.01.004

Negre, O., Eggimann, A. V., Beuzard, Y., Ribeil, J. A., Bourget, P., Borwornpinyo, S., … Payen, E. (2016). Gene Therapy of the β-Hemoglobinopathies by Lentiviral Transfer of the β a(T87Q) -Globin Gene. *Human Gene Therapy*, *27*(2), 148–165. https://doi.org/10.1089/hum.2016.007

Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. D., Donovan, A., Ward, D. M. V., … Kaplan, J. (2004). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, *306*(5704), 2090–2093. https://doi.org/10.1126/science.1104742

Neubauer, H., Cumano, A., Wu, H., Huffstadt, U., & Pfeffer, K. (1998). Jak2 Deficiency Defines an Essential Hematopoiesis. *Cell*, *93*, 397–409.

Neumann, F., & Krawinkel, U. (1997). Constitutive expression of human ribosomal protein L7 arrests the cell cycle in G1 and induces apoptosis in Jurkat T-lymphoma cells. *Experimental Cell Research*. https://doi.org/10.1006/excr.1996.3417

Nocka, K., Majumder, S., Chabot, B., Ray, P., Cervone, M., Bernstein, A., & Besmer, P. (1989). Expression of c-kit gene products in known cellular targets of W mutations in normal and W mutant mice--evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice. *Genes & Development*, *3*(6), 816–826. https://doi.org/10.1101/gad.3.6.816

Notta, F., Zandi, S., Takayama, N., Dobson, S., Gan, O. I., Wilson, G., … Cyrille, F. (2016). *Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts DISTINCT ROUTES OF LINEAGE DEVELOPMENT RESHAPE THE HUMAN BLOOD HIERARCHY ACROSS ONTOGENY*. *351*(6269), 1–22. https://doi.org/10.1126/science.aab2116.DISTINCT

Novak, I., Kirkin, V., McEwan, D. G., Zhang, J., Wild, P., Rozenknop, A., … Dikic, I. (2010). Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Reports*, *11*(1), 45–51. https://doi.org/10.1038/embor.2009.256

Novak, J. P., & Stewart, C. C. (1991). Stochastic versus deterministic in haemopoiesis: what is

what? *British Journal of Haematology*, *78*(2), 149–154. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1991.tb04409.x

Nylandsted, J., Gyrd-Hansen, M., Danielewicz, A., Fehrenbacher, N., Lademann, U., Høyer-Hansen, M., … Jäättelä, M. (2004). Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *Journal of Experimental Medicine*, *200*(4), 425–435. https://doi.org/10.1084/jem.20040531

O'Brien, K. A., Farrar, J. E., Vlachos, A., Anderson, S. M., Tsujiura, C. A., Lichtenberg, J., … Bodine, D. M. (2017). Molecular convergence in ex vivo models of Diamond-Blackfan anemia. *Blood*, *129*(23), 3111–3120. https://doi.org/10.1182/blood-2017-01-760462

O'Donohue, M. F., Choesmel, V., Faubladier, M., Fichant, G., & Gleizes, P. E. (2010). Functional dichotomy of ribosomal proteins during the synthesis of mammalian 40S ribosomal subunits. *Journal of Cell Biology*, *190*(5), 853–866. https://doi.org/10.1083/jcb.201005117

Ofir-Rosenfeld, Y., Boggs, K., Michael, D., Kastan, M. B., & Oren, M. (2008). Mdm2 Regulates p53 mRNA Translation through Inhibitory Interactions with Ribosomal Protein L26. *Molecular Cell*, *32*(2), 180–189. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.08.031

Ogawa, M. (1991). Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *Journal of Experimental Medicine*, *174*(1), 63–71. https://doi.org/10.1084/jem.174.1.63

Ohmayer, U., Gamalinda, M., Sauert, M., Ossowski, J., Pöll, G., Linnemann, J., … Milkereit, P. (2013). Studies on the Assembly Characteristics of Large Subunit Ribosomal Proteins in S. cerevisae. *PLoS ONE*, *8*(7), 1–24. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068412

Okumura, N., Tsuji, K., & Nakahata, T. (1992). Changes in cell surface antigen expressions during proliferation and differentiation of human erythroid progenitors. *Blood*, *80*(3), 642–650.

Onishi, M., Nosaka, T., Misawa, K., Mui, A. L.-F., Gorman, D., McMahon, M., … Kitamura, T. (1998). Identification and Characterization of a Constitutively Active STAT5 Mutant That Promotes Cell Proliferation. *Molecular and Cellular Biology*, *18*(7), 3871–3879. https://doi.org/10.1128/mcb.18.7.3871

Orkin, S. (1992). GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood*, *80*(3), 575–581. https://doi.org/10.1182/blood.V80.3.575.575

Orkin, S. H., Kazazian, H. H., Antonarakis, S. E., Goff, S. C., Boehm, C. D., Sexton, J. P., … Giardina, P. J. V. (1982). Linkage of β-thalassaemia mutations and β-globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human β-globin gene cluster. *Nature*, *296*(5858), 627–631. https://doi.org/10.1038/296627a0

Osborn, M. J., Lonetree, C. L., Webber, B. R., Patel, D., Dunmire, S., Defeo, A. P., … Tolar, J. (2016). CRISPR/Cas9 targeted gene editing and cellular engineering in fanconi anemia. *Stem Cells and Development*, *25*(20), 1591–1603. https://doi.org/10.1089/scd.2016.0149

Ostronoff, M., Florencio, R., Campos, G., Arruda, S., Matias, C., Florencio, M., … Matias, K. (2004). Successful nonmyeloablative bone marrow transplantation in a corticosteroid-resistant infant with Diamond-Blackfan anemia [2]. *Bone Marrow Transplantation*, *34*(4), 371–372. https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1704592

Otto, H., Conz, C., Maier, P., Wolfle, T., Suzuki, C. K., Jeno, P., … Rospert, S. (2005). The chaperones MPP11 and Hsp70L1 form the mammalian ribosome-associated complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(29), 10064–10069. https://doi.org/10.1073/pnas.0504400102

Paddy, M. R., Belmont, A. S., Saumweber, H., Agard, D. A., & Sedat, J. W. (1990). *Interphase Nuclear Envelope Lamins Form a Discontinuous Network That Interacts with Only a Fraction of the Chromatin in the Nuclear Periphery*. *62*.

Pal, S., Cantor, A. B., Johnson, K. D., Moran, T. B., Boyer, M. E., Orkin, S. H., & Bresnick, E. H. (2004). Coregulator-dependent facilitation of chromatin occupancy by GATA-1.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, *101*(4), 980–985. https://doi.org/10.1073/pnas.0307612100

Palis, J. (2014). Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Frontiers in Physiology*, *5 JAN*(January), 1–9. https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00003

Paolini, N. A., Attwood, M., Sondalle, S. B., Vieira, C. M. dos S., van Adrichem, A. M., di Summa, F. M., … MacInnes, A. W. (2017). A Ribosomopathy Reveals Decoding Defective Ribosomes Driving Human Dysmorphism. *American Journal of Human Genetics*. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.01.034

Papetti, M., Wontakal, S. N., Stopka, T., & Skoultchi, A. I. (2010). GATA-1 directly regulates p21 gene expression during erythroid differentiation. *Cell Cycle*, *9*(10), 1972–1980. https://doi.org/10.4161/cc.9.10.11602

Park, H. S., Lee, J. S., Huh, S. H., Seo, J. S., & Choi, E. J. (2001). Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *EMBO Journal*, *20*(3), 446–456. https://doi.org/10.1093/emboj/20.3.446

Parkins, A. C., Sharpe, A. H., & Orkin, S. H. (1995). Lethal β-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature*, Vol. 375, pp. 318–322. https://doi.org/10.1038/375318a0

Parrella, S., Aspesi, A., Quarello, P., Garelli, E., Pavesi, E., Carando, A., … Dianzani, I. (2014). Loss of GATA-1 full length as a cause of Diamond-Blackfan anemia phenotype. *Pediatric Blood and Cancer*, *61*(7), 1319–1321. https://doi.org/10.1002/pbc.24944

Passegué, E., Wagers, A. J., Giuriato, S., Anderson, W. C., & Weissman, I. L. (2005). Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *Journal of Experimental Medicine*, *202*(11), 1599–1611. https://doi.org/10.1084/jem.20050967

Pausch, P., Singh, U., Ahmed, Y. L., Pillet, B., Murat, G., Altegoer, F., … Kressler, D. (2015). Co-translational capturing of nascent ribosomal proteins by their dedicated chaperones. *Nature Communications*, *6*(May), 1–15. https://doi.org/10.1038/ncomms8494

Peffault De Latour, R., Peters, C., Gibson, B., Strahm, B., Lankester, A., De Heredia, C. D., … Dalle, J. H. (2015). Recommendations on hematopoietic stem cell transplantation for inherited bone marrow failure syndromes. *Bone Marrow Transplantation*, *50*(9), 1168–1172. https://doi.org/10.1038/bmt.2015.117

Peller, S., Frenkel, J., Lapidot, T., Kahn, J., Rahimi-Levene, N., Yona, R., … Rotter, V. (2003). The onset of p53-dependent apoptosis plays a role in terminal differentiation of human normoblasts. *Oncogene*, *22*(30), 4648–4655. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206541

Peltola, K. J., Paukku, K., Aho, T. L. T., Ruuska, M., Silvennoinen, O., & Koskinen, P. J. (2004). Pim-1 kinase inhibits STAT5-dependent transcription via its interactions with SOCS1 and SOCS3. *Blood*, *103*(10), 3744–3750. https://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3126

Peña, C., Schütz, S., Fischer, U., Chang, Y., & Panse, V. G. (2016). Prefabrication of a ribosomal protein subcomplex essential for eukaryotic ribosome formation. *ELife*, *5*(DECEMBER2016), 1–21. https://doi.org/10.7554/eLife.21755

Peng Xu, Lance E. Palmer, Christophe Lechauve, Guowei Zhao, Yu Yao, J. L. (2019). *Regulation of gene expression by miR-144 / 451 during mouse erythropoiesis Regulation of gene expression by miR-144 / 451 during mouse erythropoiesis Correspondence : Department of Hematology St . Jude Children ' s Research Hospital Division of Hematology*. https://doi.org/10.1182/blood.2018854604

Perrin, M. C., Blanchet, J. P., & Mouchiroud, G. (1996). *Modulation of human and mouse erythropoiesis by thyroid hormone and retinoic acid : evidence for specific effects at different steps of the erythroid pathway* *. 17–18.

Persons, D. A., Allay, J. A., Allay, E. R., Ashmun, R. A., Orlic, D., Jane, S. M., … Nienhuis,

A. W. (1999). Enforced Expression of the GATA-2 Transcription Factor Blocks Normal Hematopoiesis. *Blood*, *93*(2), 488–499. https://doi.org/10.1182/blood.V93.2.488.402k17_488_499

Pietras, E. M., Mirantes-Barbeito, C., Fong, S., Loeffler, D., Kovtonyuk, L. V., Zhang, S., … Passegué, E. (2016). Chronic interleukin-1 exposure drives haematopoietic stem cells towards precocious myeloid differentiation at the expense of self-renewal. *Nature Cell Biology*, *18*(6), 607–618. https://doi.org/10.1038/ncb3346

Pillet, B., García-Gómez, J. J., Pausch, P., Falquet, L., Bange, G., de la Cruz, J., & Kressler, D. (2015). The Dedicated Chaperone Acl4 Escorts Ribosomal Protein Rpl4 to Its Nuclear Pre-60S Assembly Site. *PLoS Genetics*, *11*(10), 1–34. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005565

Poletti, V., & Mavilio, F. (2018). Interactions between Retroviruses and the Host Cell Genome. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, *8*(March), 31–41. https://doi.org/10.1016/j.omtm.2017.10.001

Pöll, G., Braun, T., Jakovljevic, J., Neueder, A., Jakob, S., Woolford, J. L., … Milkereit, P. (2009). rRNA maturation in yeast cells depleted of large ribosomal subunit proteins. *PLoS ONE*, *4*(12). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008249

Ponce, L. L., Navarro, J. C., Ahmed, O., & Robertson, C. S. (2013). Erythropoietin neuroprotection with traumatic brain injury. *Pathophysiology*. https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2012.02.005

Popova, E. Y., Krauss, S. W., Short, S. A., Lee, G., Villalobos, J., Etzell, J., … Grigoryev, S. A. (2009). Chromatin condensation in terminally differentiating mouse erythroblasts does not involve special architectural proteins but depends on histone deacetylation. *Chromosome Research*, *17*(1), 47–64. https://doi.org/10.1007/s10577-008-9005-y

Porter, J. B., Walter, P. B., Neumayr, L. D., Evans, P., Bansal, S., Garbowski, M., … Vichinsky, E. (2014). Mechanisms of plasma non-transferrin bound iron generation: insights from comparing transfused diamond blackfan anaemia with sickle cell and thalassaemia patients. *British Journal of Haematology*, *167*(5), 692–696. https://doi.org/10.1111/bjh.13081

Quarello, P., Garelli, E., Brusco, A., Carando, A., Mancini, C., Pappi, P., … Ramenghi, U. (2012). High frequency of ribosomal protein gene deletions in Italian Diamond-Blackfan anemia patients detected by multiplex ligation-dependent probe amplification assay. *Haematologica*, *97*(12), 1813–1817. https://doi.org/10.3324/haematol.2012.062281

Quarello, P., Garelli, E., Carando, A., Brusco, A., Calabrese, R., Dufour, C., … Ramenghi, U. (2010). Diamond-blackfan anemia: Genotype-phenotype correlations in Italian patients with RPL5 and RPL11 mutations. *Haematologica*, *95*(2), 206–213. https://doi.org/10.3324/haematol.2009.011783

Quelle, F. W., Wang, D., Nosaka, T., Thierfelder, W. E., Stravopodis, D., Weinstein, Y., & Ihle, J. N. (1996). Erythropoietin induces activation of Stat5 through association with specific tyrosines on the receptor that are not required for a mitogenic response. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(4), 1622–1631. https://doi.org/10.1128/mcb.16.4.1622

Radons, J. (2016). The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress and Chaperones*, *21*(3), 379–404. https://doi.org/10.1007/s12192-016-0676-6

Raich, N., & Romeo, P. -H. (1993). Erythroid regulatory elements. *Stem Cells*, *11*(2), 95–104. https://doi.org/10.1002/stem.5530110204

Ramenghi, U., Campagnoli, M. F., Garelli, E., Carando, A., Brusco, A., Bagnara, G. P., … Dianzani, I. (2000). Diamond-Blackfan anemia: Report of seven further mutations in the RPS19 gene and evidence of mutation heterogeneity in the Italian population. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *26*(5), 417–422. https://doi.org/10.1006/bcmd.2000.0324

Ramos, P., Casu, C., Gardenghi, S., Breda, L., Crielaard, B. J., Guy, E., … Rivella, S. (2013).

Macrophages support pathological erythropoiesis in polycythemia vera and β-thalassemia. *Nature Medicine*, *19*(4), 437–445. https://doi.org/10.1038/nm.3126

Rappa, F., Farina, F., Zummo, G., David, S., Campanella, C., Carini, F., … Macario, A. J. L. (2012). HSP-Molecular chaperones in cancer biogenesis and tumor therapy: An overview. *Anticancer Research*, *32*(12), 5139–5150.

Rasmussen, K. D., Simmini, S., Abreu-Goodger, C., Bartonicek, N., Di Giacomo, M., Bilbao-Cortes, D., … O'Carroll, D. (2010). The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis. *Journal of Experimental Medicine*, *207*(7), 1351–1358. https://doi.org/10.1084/jem.20100458

Rekhtman, N., Radparvar, F., Evans, T., & Skoultchi, A. I. (1999). Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA- 1: Functional antagonism in erythroid cells. *Genes and Development*, *13*(11), 1398–1411. https://doi.org/10.1101/gad.13.11.1398

Rhodes, M. M., Kopsombut, P., Bondurant, M. C., Price, J. O., & Koury, M. J. (2008). Adherence to macrophages in erythroblastic islands enhances erythroblast proliferation and increases erythrocyte production by a different mechanism than erythropoietin. *Blood*, *111*(3), 1700–1708. https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-098178

Ribeil, J., Zermati, Y., Vandekerckhove, J., Cathelin, S., Kersual, J., Moura, I. C., … Hermine, O. (2007). *Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1*. *445*(January), 3–6. https://doi.org/10.1038/nature05378

Richmond, T. D., Chohan, M., & Barber, D. L. (2005). Turning cells red: Signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends in Cell Biology*, *15*(3), 146–155. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.01.007

Rio, S., Gastou, M., Karboul, N., Derman, R., Suriyun, T., Manceau, H., … Da Costa, L. (2019). Regulation of globin-heme balance in Diamond-Blackfan anemia by HSP70/GATA1. *Blood*, *133*(12), 1358–1370. https://doi.org/10.1182/blood-2018-09-875674

Robinson, M. S. (1994). The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Current Opinion in Cell Biology*, *6*(4), 538–544. https://doi.org/10.1016/0955-0674(94)90074-4

Robledo, S., Idol, R. A., Crimmins, D. L., Ladenson, J. H., Mason, P. J., & Bessler, M. (2008). The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production. *Rna*, *14*(9), 1918–1929. https://doi.org/10.1261/rna.1132008

Rodrigues, N. P., Janzen, V., Forkert, R., Dombkowski, D. M., Boyd, A. S., Orkin, S. H., … Scadden, D. T. (2005). Haploinsufficiency of GATA-2 perturbs adult hematopoietic stem-cell homeostasis. *Blood*, *106*(2), 477–484. https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-2989

Rogala-Koziarska, K., Samluk, Ł., & Nałęcz, K. A. (2019). Amino acid transporter SLC6A14 depends on heat shock protein HSP90 in trafficking to the cell surface. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1866*(10), 1544–1555. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.07.009

Rönnstrand, L. (2004). Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *61*(19–20), 2535–2548. https://doi.org/10.1007/s00018-004-4189-6

Roskoski, R. (2005). Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase - The stem cell factor receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *338*(3), 1307–1315. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.150

Rössler, I., Embacher, J., Pillet, B., Murat, G., Liesinger, L., Hafner, J., … Pertschy, B. (2019). Tsr4 and Nap1, two novel members of the ribosomal protein chaperOME. *Nucleic Acids Research*, *47*(13), 6984–7002. https://doi.org/10.1093/nar/gkz317

Rouquette, J., Choesmel, V., & Gleizes, P. E. (2005). Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells. *EMBO Journal*, *24*(16), 2862–2872. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600752

Roy, V., Pérez, W. S., Eapen, M., Marsh, J. C. W., Pasquini, M., Pasquini, R., … Orchard, P. J. (2005). Bone marrow transplantation for diamond-blackfan anemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *11*(8), 600–608. https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2005.05.005

Rudd, C. E. (2001). Lnk adaptor: novel negative regulator of B cell lymphopoiesis. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*, *2001*(85), 5–8. https://doi.org/10.1126/stke.2001.85.pe1

Rudnick, G., Krämer, R., Blakely, R. D., Murphy, D. L., & Verrey, F. (2014). The SLC6 transporters: Perspectives on structure, functions, regulation, and models for transporter dysfunction. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. https://doi.org/10.1007/s00424-013-1410-1

Rumman, M., Dhawan, J., & Kassem, M. (2015). Concise Review: Quiescence in Adult Stem Cells: Biological Significance and Relevance to Tissue Regeneration. *STEM CELLS*, *33*(10), 2903–2912. https://doi.org/10.1002/stem.2056

Ryan, J. J., Huang, H., McReynolds, L. J., Shelburne, C., Hu-Li, J., Huff, T. F., & Paul, W. E. (1997). Stem cell factor activates STAT-5 DNA binding in IL-3-derived bone marrow mast cells. *Experimental Hematology*.

Sadahira, Y., & Mori, M. (1999). Role of the macrophage in erythropoiesis. *Pathology International*, *49*(10), 841–848. https://doi.org/10.1046/j.1440-1827.1999.00954.x

Sadahira, Y., Wada, H., Manabe, T., & Yawata, Y. (1999). Immunohistochemical assessment of human bone marrow macrophages in hematologic disorders. *Pathology International*, *49*(7), 626–632. https://doi.org/10.1046/j.1440-1827.1999.00913.x

Sadahira, Y., Yoshino, T., & Monobe, Y. (1995). Very late activation antigen 4-vascular cell adhesion molecule 1 interaction is involved in the formation of erythroblastic Islands. *Journal of Experimental Medicine*. https://doi.org/10.1084/jem.181.1.411

Sahara, S., Aoto, M., Eguchi, Y., Imamoto, N., Yoneda, Y., & Tsujimoto, Y. (1999). *Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation*. *401*(September).

Sahin, S., Adrovic, A., Barut, K., Baran, S., Tahir Turanli, E., Canpolat, N., … Kasapcopur, O. (2019). A 9.5-year-old boy with recurrent neurological manifestations and severe hypertension, treated initially for polyarteritis nodosa, was subsequently diagnosed with adenosine deaminase type 2 deficiency (DADA2) which responded to anti-TNF-α. *Paediatrics and International Child Health*. https://doi.org/10.1080/20469047.2018.1559495

Saleh, A., Srinivasula, S. M., Balkir, L., Robbins, P. D., & Alnemri, E. S. (2000). Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nature Cell Biology*, *2*(8), 476–483. https://doi.org/10.1038/35019510

Salminen, A., Ojala, J., & Kaarniranta, K. (2011). *Apoptosis and aging : increased resistance to apoptosis enhances the aging process*. 1021–1031. https://doi.org/10.1007/s00018-010-0597-y

Sandoval, H., Thiagarajan, P., Dasgupta, S. K., Schumacher, A., Prchal, J. T., Chen, M., & Wang, J. (2008). Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature*, *454*(7201), 232–235. https://doi.org/10.1038/nature07006

Sankaran, V. G., Ghazvinian, R., Do, R., Thiru, P., Vergilio, J., Beggs, A. H., … Gazda, H. T. (2012). Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. *Journal of Clinical Investigation*, *122*(7), 2439–2443. https://doi.org/10.1172/JCI63597

Sankaran, V. G., Orkin, S. H., & Walkley, C. R. (2008). Rb intrinsically promotes erythropoiesis by coupling cell cycle exit with mitochondrial biogenesis. *Genes and Development*, *22*(4), 463–475. https://doi.org/10.1101/gad.1627208

Santiago, T. M. G., Zavialov, A., Saarela, J., Seppanen, M., Reed, A. M., Abraham, R. S., & Gibson, L. E. (2015). Dermatologic features of ADA2 deficiency in cutaneous polyarteritis nodosa. *JAMA Dermatology*. https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2015.1635

Santos, S. C. R., Lacronique, V., Bouchaert, I., Monni, R., Bernard, O., Gisselbrecht, S., & Gouilleux, F. (2001). Constitutively active STAT5 variants induce growth and survival of hematopoietic cells through a PI 3-kinase/Akt dependent pathway. *Oncogene*, *20*(17), 2080–2090. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204308

Sarkar, S., Perlstein, E. O., Imarisio, S., Pineau, S., Cordenier, A., Maglathlin, R. L., … Rubinsztein, D. C. (2007). Small molecules enhance autophagy and reduce toxicity in Huntington's disease models. *Nature Chemical Biology*, *3*(6), 331–338. https://doi.org/10.1038/nchembio883

Sasaki, A., Yasukawa, H., Shouda, T., Kitamura, T., Dikic, I., & Yoshimura, A. (2000). CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(38), 29338–29347. https://doi.org/10.1074/jbc.M003456200

Sasaki, A., Yasukawa, H., Suzuki, A., Kamizono, S., Syoda, T., Kinjyo, I., … Yoshimura, A. (1999). Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes to Cells*, *3*, 339–351.

Sathyanarayana, P., Dev, A., Fang, J., Houde, E., Bogacheva, O., Bogachev, O., … Wojchowski, D. M. (2008). EPO receptor circuits for primary erythroblast survival. *Blood*, *111*(11), 5390–5399. https://doi.org/10.1182/blood-2007-10-119743

Sauer, R. T., Bolon, D. N., Burton, B. M., Burton, R. E., Flynn, J. M., Grant, R. A., … Baker, T. A. (2004, October). Sculpting the proteome with AAA+ proteases and disassembly machines. *Cell*, Vol. 119, pp. 9–18. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.020

Schilders, G., van Dijk, E., & Pruijn, G. J. M. (2007). C1D and hMtr4p associate with the human exosome subunit PM/Scl-100 and are involved in pre-rRNA processing. *Nucleic Acids Research*, *35*(8), 2564–2572. https://doi.org/10.1093/nar/gkm082

Schlieker, C., Bukau, B., & Mogk, A. (2002). Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the E. coli cytosol: Implications for their applicability in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, *96*(1), 13–21. https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00033-0

Schmidt, U., Van Den Akker, E., Parren-Van Amelsvoort, M., Litos, G., De Bruijn, M., Gutiérrez, L., … Von Lindern, M. (2004). Btk Is Required for an Efficient Response to Erythropoietin and for SCF-controlled Protection against TRAIL in Erythroid Progenitors. *Journal of Experimental Medicine*, *199*(6), 785–795. https://doi.org/10.1084/jem.20031109

Schuermann, J. P., Jiang, J., Cuellar, J., Llorca, O., Wang, L., Gimenez, L. E., … Sousa, R. (2008). Structure of the Hsp110:Hsc70 Nucleotide Exchange Machine. *Molecular Cell*. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.006

Schütz, S., Fischer, U., Altvater, M., Nerurkar, P., Peña, C., Gerber, M., … Panse, V. G. (2014). A RanGTP-independent mechanism allows ribosomal protein nuclear import for ribosome assembly. *ELife*, *3*, e03473. https://doi.org/10.7554/eLife.03473

Schütz, S., Michel, E., Damberger, F. F., Oplová, M., Peña, C., Leitner, A., … Panse, V. G. (2018). Molecular basis for disassembly of an importin:ribosomal protein complex by the escortin Tsr2. *Nature Communications*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-018-06160-x

Schweers, R. L., Zhang, J., Randall, M. S., Loyd, M. R., Li, W., Dorsey, F. C., … Ney, P. A. (2007). NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(49), 19500–19505. https://doi.org/10.1073/pnas.0708818104

Scognamiglio, R., Cabezas-Wallscheid, N., Thier, M. C., Altamura, S., Reyes, A., Prendergast, Á. M., … Trumpp, A. (2016). Myc Depletion Induces a Pluripotent Dormant State Mimicking Diapause. *Cell*, *164*(4), 668–680. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.033

Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J., & Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*, *265*(5178), 1573–1577. https://doi.org/10.1126/science.8079170

Seo, J. S., Park, Y. M., Kim, J. Il, Shim, E. H., Kim, C. W., Jang, J. J., … Lee, W. H. (1996). T cell lymphoma in transgenic mice expressing the human Hsp70 gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *218*(2), 582–587. https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0103

Shah, P., Ding, Y., Niemczyk, M., Kudla, G., & Plotkin, J. B. (2013). Rate-Limiting Steps in Yeast Protein Translation. *Cell*, *153*(7), 1589–1601. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.049

Shahani, S., Braga-Basaria, M., Maggio, M., & Basaria, S. (2009). Androgens and erythropoiesis: Past and present. *Journal of Endocrinological Investigation*, *32*(8), 704–716. https://doi.org/10.3275/6149

Shen, J., Wu, Y., Xu, J. Y., Zhang, J., Sinclair, S. H., Yanoff, M., … Xu, G. T. (2010). ERK- and Akt-dependent neuroprotection by erythropoietin (EPO) against glyoxal-AGEs via modulation of Bcl-xL, Bax, and BAD. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. https://doi.org/10.1167/iovs.09-3544

Shi, X., Wang, H., Kong, F., Xu, Q., Xiao, F., Yang, Y., … Wang, L. (2016). *Exosomal miR-486 regulates hypoxia-induced erythroid differentiation of erythroleukemia cells through targeting Sirt1*. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.12.023

Shimamura, A., & Alter, B. P. (2010). Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Blood Reviews*, *24*(3), 101–122. https://doi.org/10.1016/j.blre.2010.03.002

Shimizu, R., Komatsu, N., Nakamura, Y., Nakauchi, H., Nakabeppu, Y., & Miura, Y. (1996). Role of c-jun in the inhibition of erythropoietin receptor-mediated apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *222*(1), 1–6. https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0688

Shimizu, R., & Yamamoto, M. (2005). Gene expression regulation and domain function of hematopoietic GATA factors. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *16*(1), 129–136. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2004.11.001

Shimizu, R., & Yamamoto, M. (2016). GATA-related hematologic disorders. *Experimental Hematology*, *44*(8), 696–705. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2016.05.010

Shivdasani, R.A., Mayer, E.L. & Orkin, S. H. (n.d.). *Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL*.

Shu, S., & Ye, K. (2018). Structural and functional analysis of ribosome assembly factor Efg1. *Nucleic Acids Research*, *46*(4), 2096–2106. https://doi.org/10.1093/nar/gky011

Siatecka, M., & Bieker, J. J. (2011). The multifunctional role of EKLF/KLF1 during erythropoiesis. *Blood*, *118*(8), 2044–2054. https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-331371

Siatecka, M., Soni, S., Planutis, A., & Bieker, J. J. (2015). Transcriptional activity of erythroid kruppel-like factor (EKLF/KLF1) modulated by PIAS3 (Protein inhibitor of activated STAT3). *Journal of Biological Chemistry*, *290*(15), 9929–9940. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.610246

Sieff, C. A., Yang, J., Merida-Long, L. B., & Lodish, H. F. (2010). Pathogenesis of the erythroid failure in Diamond Blackfan anaemia. *British Journal of Haematology*, *148*(4), 611–622. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07993.x

Sinclair, A. M. (2013). Erythropoiesis stimulating agents: Approaches to modulate activity. *Biologics: Targets and Therapy*, *7*(1), 161–174. https://doi.org/10.2147/BTT.S45971

Sivertsen, E. A., Hystad, M. E., Gutzkow, K. B., Døsen, G., Smeland, E. B., Blomhoff, H. K., & Myklebust, J. H. (2006). PI3K/Akt-dependent Epo-induced signalling and target genes in human early erythroid progenitor cells. *British Journal of Haematology*, *135*(1), 117–128. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06252.x

Skrabl-Baumgartner, A., Plecko, B., Schmidt, W. M., König, N., Hershfield, M., Gruber-Sedlmayr, U., & Lee-Kirsch, M. A. (2017). Autoimmune phenotype with type i interferon signature in two brothers with ADA2 deficiency carrying a novel CECR1 mutation. *Pediatric Rheumatology*. https://doi.org/10.1186/s12969-017-0193-x

Skvarova Kramarzova, K., Osborn, M. J., Webber, B. R., Defeo, A. P., McElroy, A. N., Kim, C. J., & Tolar, J. (2017). CRISPR/Cas9-mediated correction of the FANCD1 Gene in primary patient cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(6), 1–15. https://doi.org/10.3390/ijms18061269

Sloan, K. E., Mattijssen, S., Lebaron, S., Tollervey, D., Pruijn, G. J. M., & Watkins, N. J. (2013). Both endonucleolytic and exonucleolytic cleavage mediate ITS1 removal during human ribosomal RNA processing. *Journal of Cell Biology*, *200*(5), 577–588. https://doi.org/10.1083/jcb.201207131

Socolovsky, M., Fallon, A. E. ., Wang, S., Brugnara, C., & Lodish, H. F. (1999). Fetal Anemia and Apoptosis of Red Cell Progenitors in Stat5a−/−5b−/− Mice. *Cell*, *98*(2), 181–191. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81013-2

Soler, E., Andrieu-Soler, C., De Boer, E., Bryne, J. C., Thongjuea, S., Stadhouders, R., … Grosveld, F. (2010). The genome-wide dynamics of the binding of Ldb1 complexes during erythroid differentiation. *Genes and Development*, *24*(3), 277–289. https://doi.org/10.1101/gad.551810

Soltanieh, S., Lapensée, M., & Dragon, F. (2014). Nucleolar proteins Bfr2 and Enp2 interact with DEAD-box RNA helicase Dbp4 in two different complexes. *Nucleic Acids Research*, *42*(5), 3194–3206. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1293

Soltanieh, S., Osheim, Y. N., Spasov, K., Trahan, C., Beyer, A. L., & Dragon, F. (2015). DEAD-Box RNA Helicase Dbp4 Is Required for Small-Subunit Processome Formation and Function. *Molecular and Cellular Biology*, *35*(5), 816–830. https://doi.org/10.1128/mcb.01348-14

Somervaille, T. C. P., Linch, D. C., & 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*(5), 1374–1381. https://doi.org/10.1182/blood.V98.5.1374

Song, B., Fan, Y., He, W., Zhu, D., Niu, X., Wang, D., … Sun, X. (2015). Improved hematopoietic differentiation efficiency of gene-corrected beta-thalassemia induced pluripotent stem cells by CRISPR/Cas9 system. *Stem Cells and Development*, *24*(9), 1053–1065. https://doi.org/10.1089/scd.2014.0347

Soni, S., Bala, S., Gwynn, B., Sahr, K. E., Peters, L. L., & Hanspal, M. (2006). Absence of erythroblast macrophage protein (Emp) leads to failure of erythroblast nuclear extrusion. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(29), 20181–20189. https://doi.org/10.1074/jbc.M603226200

Sorkin, A., McKinsey, T., Shih, W., Kirchhausen, T., & Carpenter, G. (1995). Stoichiometric interaction of the epidermal growth factor receptor with the clathrin-associated protein complex AP-2. *Journal of Biological Chemistry*. https://doi.org/10.1074/jbc.270.2.619

Soulet, F., Al Saati, T., Roga, S., Amalric, F., & Bouche, G. (2001). Fibroblast growth factor-2 interacts with free ribosomal protein S19. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *289*(2), 591–596. https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5960

Spivak, J. L., Smith, R. R. L., & Ihwe, J. N. (1985). *Interleukin 3 Promotes the In Vitro Proliferation of Murine Pluripotent Hematopoietic Stem Cells*. *76*(October), 1613–1621.

Springer, J. M., Gierer, S. A., Jiang, H., Kleiner, D., Deuitch, N., Ombrello, A. K., … Aksentijevich, I. (2018). Deficiency of adenosine deaminase 2 in adult siblings: Many years of a misdiagnosed disease with severe consequences. *Frontiers in Immunology*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01361

Stankiewicz, A. R., Lachapelle, G., Foo, C. P. Z., Radicioni, S. M., & Mosser, D. D. (2005). Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(46), 38729–38739. https://doi.org/10.1074/jbc.M509497200

Starr, R., & Hilton, D. J. (1999). Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *21*(1), 47–52. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199901)21:1<47::AID-BIES6>3.0.CO;2-N

Steinbusch, M. M. F., Caron, M. M. J., Surtel, D. A. M., Friedrich, F., Lausch, E., Pruijn, G. J. M., … Welting, T. J. M. (2017). Expression of RMRP RNA is regulated in chondrocyte hypertrophy and determines chondrogenic differentiation. *Scientific Reports*. https://doi.org/10.1038/s41598-017-06809-5

Stelter, P., Huber, F. M., Kunze, R., Flemming, D., Hoelz, A., & Hurt, E. (2015). Coordinated Ribosomal L4 Protein Assembly into the Pre-Ribosome Is Regulated by Its Eukaryote-Specific Extension. *Molecular Cell*, *58*(5), 854–862. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.03.029

Stopka, T., Amanatullah, D. F., Papetti, M., & Skoultchi, A. I. (2005). PU.1 inhibits the erythroid program by binding to GATA-1 on DNA and creating a repressive chromatin structure. *EMBO Journal*, *24*(21), 3712–3723. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600834

Sugatani, T., & Hruska, K. A. (2009). Impaired micro-RNA pathways diminish osteoclast differentiation and function. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(7), 4667–4678. https://doi.org/10.1074/jbc.M805777200

Sui, X., Krantz, S. B., You, M., & Zhao, Z. (1998). Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis. *Blood*, *92*(4), 1142–1149.

Sun, J., Ramos, A., Chapman, B., Johnnidis, J. B., Le, L., Ho, Y. J., … Camargo, F. D. (2014). Clonal dynamics of native haematopoiesis. *Nature*, *514*(7522), 322–327. https://doi.org/10.1038/nature13824

Sun, X. X., DeVine, T., Challagundla, K. B., & Dai, M. S. (2011). Interplay between ribosomal protein S27a and MDM2 protein in p53 activation in response to ribosomal stress. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(26), 22730–22741. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.223651

Suzuki, K., Olvera, J., & Wool, I. G. (1990). The primary structure of rat ribosomal protein L9. *Gene*, *93*(2), 297–300. https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90239-N

Swartz, K. L., Wood, S. N., Murthy, T., Ramirez, O., Qin, G., Pillai, M. M., … Minella, A. C. (2017). E2F-2 Promotes Nuclear Condensation and Enucleation of Terminally Differentiated Erythroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, *37*(1), 1–18. https://doi.org/10.1128/MCB.00274-16

Tafforeau, L., Zorbas, C., Langhendries, J. L., Mullineux, S. T., Stamatopoulou, V., Mullier, R., … Lafontaine, D. L. J. (2013). The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of pre-rRNA processing factors. *Molecular Cell*, *51*(4), 539–551. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.011

Taichman, R. S. (2005). Blood and bone: Two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*, *105*(7), 2631–2639. https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2480

Tanguay, R. M., Wu, Y., & Khandjian, E. W. (1993). Tissue-specific expression of heat shock proteins of the mouse in the absence of stress. *Developmental Genetics*, *14*(2), 112–118.

https://doi.org/10.1002/dvg.1020140205
Taylor, M., Qu, A., Anderson, E. R., Matsubara, T., Martin, A., Gonzalez, F. J., & Shah, Y. M. (2011). Hypoxia-inducible factor-2α mediates the adaptive increase of intestinal ferroportin during iron deficiency in mice. *Gastroenterology*, *140*(7), 2044–2055. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.03.007
Testa, U. (2004). Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia*, *18*(7), 1176–1199. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403383
Thomas, F., & Kutay, U. (2003). Biogenesis and nuclear export of ribosomal subunits in higher eukaryotes depend on the CRM1 export pathway. *Journal of Cell Science*, *116*(12), 2409–2419. https://doi.org/10.1242/jcs.00464
Tian, Y., Bustos, V., Flajolet, M., & Greengard, P. (2011). A small-molecule enhancer of autophagy decreases levels of Aβ and APP-CTF via Atg5-dependent autophagy pathway. *FASEB Journal*, *25*(6), 1934–1942. https://doi.org/10.1096/fj.10-175158
Tilg, H., Ulmer, H., Kaser, A., & Weiss, G. (2002). Role of IL-10 for Induction of Anemia During Inflammation. *The Journal of Immunology*, *169*(4), 2204–2209. https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.4.2204
TILL, J. E., & McCULLOCH, E. A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Research*, *14*, 213–222. https://doi.org/13776896
Till, J. E., McCulloch, E. A., & Siminovitch, L. (1964). A STOCHASTIC MODEL OF STEM CELL PROLIFERATION, BASED ON THE GROWTH OF SPLEEN COLONY-FORMING CELLS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *51*(1), 29–36. https://doi.org/10.1073/pnas.51.1.29
Ting, Y. H., Lu, T. J., Johnson, A. W., Shie, J. T., Chen, B. R., Suresh Kumar, S., & Lo, K. Y. (2017). Bcp1 Is the Nuclear Chaperone of Rpl23 in Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(2), 585–596. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.747634
Toki, T., Yoshida, K., Wang, R. N., Nakamura, S., Maekawa, T., Goi, K., … Ito, E. (2018). De Novo Mutations Activating Germline TP53 in an Inherited Bone-Marrow-Failure Syndrome. *American Journal of Human Genetics*, *103*(3), 440–447. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.07.020
Toksoz, D., Zsebo, K. M., Smith, K. A., Hu, S., Brankow, D., Suggs, S. V., … Williams, D. A. (1992). Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(16), 7350–7354. https://doi.org/10.1073/pnas.89.16.7350
Tompa, P., & Csermely, P. (2004). The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *FASEB Journal*. https://doi.org/10.1096/fj.04-1584rev
Tong, W., Zhang, J., & Lodish, H. F. (2005). Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood*, *105*(12), 4604–4612. https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-4093
Torihara, H., Uechi, T., Chakraborty, A., Shinya, M., Sakai, N., & Kenmochi, N. (2011). Erythropoiesis failure due to RPS19 deficiency is independent of an activated Tp53 response in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anaemia. *British Journal of Haematology*, *152*(5), 648–654. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08535.x
Trainor, C. D., Omichinski, J. G., Vandergon, T. L., Gronenborn, A. M., Clore, G. M., & Felsenfeld, G. (1996). A palindromic regulatory site within vertebrate GATA-1 promoters requires both zinc fingers of the GATA-1 DNA-binding domain for high-affinity interaction. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(5), 2238–2247. https://doi.org/10.1128/mcb.16.5.2238

Trainor, P. A., & Merrill, A. E. (2014). Ribosome biogenesis in skeletal development and the pathogenesis of skeletal disorders. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.11.010

Triantafilou, M., & Triantafilou, K. (2004). Heat-shock protein 70 and heat-shock protein 90 associate with Toll-like receptor 4 in response to bacterial lipopolysaccharide. *Biochemical Society Transactions*. https://doi.org/10.1042/BST0320636

Tripic, T., Deng, W., Cheng, Y., Zhang, Y., Vakoc, C. R., Gregory, G. D., … Blobel, G. A. (2009). SCL and associated proteins distinguish active from repressive GATA transcription factor complexes. *Blood*, *113*(10), 2191–2201. https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-169417

Trotta, C. R., Lund, E., Kahan, L., Johnson, A. W., & Dahlberg, J. E. (2003). Coordinated nuclear export of 60s ribosomal subunits and NMD3 in vertebrates. *EMBO Journal*, *22*(11), 2841–2851. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg249

Tsai, F. Y., Keller, G., Kuo, F. C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., … Orkin, S. H. (1994). An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*, *371*(6494), 221–226. https://doi.org/10.1038/371221a0

Tsai, F. Y., & Orkin, S. H. (1997). Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood*, *89*(10), 3636–3643.

Tsang, A. P., Fujiwara, Y., Horn, D. B., & Orkin, S. H. (1998). Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes and Development*, *12*(8), 1176–1188. https://doi.org/10.1101/gad.12.8.1176

Tsang, A. P., Visvader, J. E., Turner, C. A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M. J., … 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*(1), 109–119. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80318-9

Uechi, T., Nakajima, Y., Chakraborty, A., Torihara, H., Higa, S., & Kenmochi, N. (2008). Deficiency of ribosomal protein S19 during early embryogenesis leads to reduction of erythrocytes in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. *Human Molecular Genetics*, *17*(20), 3204–3211. https://doi.org/10.1093/hmg/ddn216

Ulirsch, J. C., Verboon, J. M., Kazerounian, S., Guo, M. H., Yuan, D., Ludwig, L. S., … Gazda, H. T. (2019). Erratum: The Genetic Landscape of Diamond-Blackfan Anemia (The American Journal of Human Genetics (2018) 103(6) (930–947), (S0002929718304038) (10.1016/j.ajhg.2018.10.027)). *American Journal of Human Genetics*, *104*(2), 356. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.12.011

Ullrich, A., & Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, *61*(2), 203–212. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90801-K

Umemura, T., Papayannopoulou, T., & Stamatoyannopoulos, G. (1989). The mechanism of expansion of late erythroid progenitors during erythroid regeneration: target cells and effects of erythropoietin and interleukin-3. *Blood*, *73*(7), 1993–1998. https://doi.org/10.1182/blood.V73.7.1993.bloodjournal7371993

Université de Tours : mc.med.univ-tours.fr/Pages/Hemato/DES/A12-Erythropoiese.htm

Uoshima, N., Ozawa, M., Kimura, S., Tanaka, K., Wada, K., Kobayashi, Y., & Kondo, M. (1995). Changes in c-Kit expression and effects of SCF during differentiation of human erythroid progenitor cells. *British Journal of Haematology*, *91*(1), 30–36. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1995.tb05240.x

VAHLQUIST, B. (1950). THE CAUSE OF THE SEXUAL DIFFERENCES IN ERYTHROCYTE, HEMOGLOBIN AND SERUM IRON LEVELS IN HUMAN ADULTS. *Blood*, *5*(9), 874–875. https://doi.org/10.1182/blood.V5.9.874.874

Valent, P., Büsche, G., Theurl, I., Uras, I. Z., Germing, U., Stauder, R., … Hermine, O. (2018).

Normal and pathological erythropoiesis in adults: From gene regulation to targeted treatment concepts. *Haematologica*, *103*(10), 1593–1603. https://doi.org/10.3324/haematol.2018.192518

Van Eyck, L., Hershfield, M. S., Pombal, D., Kelly, S. J., Ganson, N. J., Moens, L., … Meyts, I. (2015). Hematopoietic stem cell transplantation rescues the immunologic phenotype and prevents vasculopathy in patients with adenosine deaminase 2 deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.10.010

van Montfrans, J., Zavialov, A., & Zhou, Q. (2014). Mutant ADA2 in vasculopathies. *The New England Journal of Medicine*. https://doi.org/10.1056/NEJMc1405506

van Pel, M., Fibbe, W. E., & Schepers, K. (2016). The human and murine hematopoietic stem cell niches: are they comparable? *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1370*(1), 55–64. https://doi.org/10.1111/nyas.12994

Vannucchi, A. M., Grossi, A., Rafanelli, D., Statello, M., Cinotti, S., & Rossi- Ferrini, P. (1994). Inhibition of erythropoietin production in vitro by human interferon gamma. *British Journal of Haematology*, *87*(1), 18–23. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1994.tb04864.x

Varricchio, L., Tirelli, V., Masselli, E., Ghinassi, B., Saha, N., Besmer, P., & Migliaccio, A. R. (2012). The expression of the glucocorticoid receptor in human erythroblasts is uniquely regulated by KIT Ligand: Implications for stress erythropoiesis. *Stem Cells and Development*, *21*(15), 2852–2865. https://doi.org/10.1089/scd.2011.0676

Velazquez, J. M., & Lindquist, S. (1984). hsp70: Nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. *Cell*, *36*(3), 655–662. https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90345-3

Velazquez, L., Cheng, A. M., Fleming, H. E., Furlonger, C., Vesely, S., Bernstein, A., … Pawson, T. (2002). Cytokine signaling and hematopoietic homeostasis are disrupted in Lnk-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*, *195*(12), 1599–1611. https://doi.org/10.1084/jem.20011883

Velten, L., Haas, S. F., Raffel, S., Blaszkiewicz, S., Hennig, B. P., Hirche, C., … Huber, W. (2017). *Continuous Process*. *19*(4), 271–281. https://doi.org/10.1038/ncb3493.Human

Vemuri, M. C., Schimmel, T., Colls, P., Munne, S., & Cohen, J. (2007). Derivation of human embryonic stem cells in xeno-free conditions. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-536-7_1

Venezia, T. A., Merchant, A. A., Ramos, C. A., Whitehouse, N. L., Young, A. S., Shaw, C. A., & Goodell, M. A. (2004). Molecular Signatures of Proliferation and Quiescence in Hematopoietic Stem Cells. *PLoS Biology*, *2*(10), e301. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020301

Verdier, F., Walrafen, P., Hubert, N., Chrétien, S., Gisselbrecht, S., Lacombe, C., & Mayeux, P. (2000). Proteasomes regulate the duration of erythropoietin receptor activation by controlling down-regulation of cell surface receptors. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(24), 18375–18381. https://doi.org/10.1074/jbc.275.24.18375

Vian, L., Di Carlo, M., Pelosi, E., Fazi, F., Santoro, S., Cerio, A. M., … Nervi, C. (2014). Transcriptional fine-tuning of microRNA-223 levels directs lineage choice of human hematopoietic progenitors. *Cell Death and Differentiation*, *21*(2), 290–301. https://doi.org/10.1038/cdd.2013.145

Vlachos, A., Klein, G. W., & Lipton, J. M. (2001). The diamond blackfan anemia registry: Tool for investigating the epidemiology and biology of diamond-blackfan anemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, *23*(6), 377–382. https://doi.org/10.1097/00043426-200108000-00015

Vlachos, Adrianna, & Muir, E. (2010). How I treat Diamond-Blackfan anemia. *Blood*, *116*(19), 3715–3723. https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-251090

Vlachos, Adrianna, Rosenberg, P. S., Atsidaftos, E., Alter, B. P., & Lipton, J. M. (2012). Incidence of neoplasia in Diamond Blackfan anemia: A report from the Diamond Blackfan anemia registry. *Blood*, *119*(16), 3815–3819. https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-375972

Vlachos, Adrianna, Rosenberg, P. S., Atsidaftos, E., Kang, J., Onel, K., Sharaf, R. N., … Lipton, J. M. (2018). Increased risk of colon cancer and osteogenic sarcoma in Diamond-Blackfan anemia. *Blood*, *132*(20), 2205–2208. https://doi.org/10.1182/blood-2018-05-848937

Volarević, S., Stewart, M. J., Ledermann, B., Zilberman, F., Terracciano, L., Montini, E., … Thomas, G. (2000). Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.288.5473.2045

Von Lindern, M., Zauner, W., Mellitzer, G., Steinlein, P., Fritsch, G., Huber, K., … 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*(2), 550–559.

Vos, M. J., Hageman, J., Carra, S., & Kampinga, H. H. (2008). Structural and Functional Diversities between Members of the Human HSPB ,. *Gene*, 7001–7011.

Wadman, I. A., Osada, H., Grütz, G. G., Agulnick, A. D., Westphal, H., Forster, A., & 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 Journal*, *16*(11), 3145–3157. https://doi.org/10.1093/emboj/16.11.3145

Walrafen, P., Verdier, F., Kadri, Z., Chrétien, S., Lacombe, C., & Mayeux, P. (2005). Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood*, *105*(2), 600–608. https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1216

Wan, T., Zhou, X., Chen, G., An, H., Chen, T., Zhang, W., … Cao, X. (2004). Novel heat shock protein Hsp70L1 activates dendritic cells and acts as a Th1 polarizing adjuvant. *Blood*, *103*(5), 1747–1754. https://doi.org/10.1182/blood-2003-08-2828

Wandzioch, E., Edling, C. E., Palmer, R. H., Carlsson, L., & Hallberg, B. (2004). Activation of the MAP kinase pathway by c-Kit is PI-3 kinase dependent in hematopoietic progenitor/stem cell lines. *Blood*, *104*(1), 51–57. https://doi.org/10.1182/blood-2003-07-2554

Wang, Houcai, Yu, J., Zhang, L., Xiong, Y., Chen, S., Xing, H., … Wang, J. (2014). RPS27a promotes proliferation, regulates cell cycle progression and inhibits apoptosis of leukemia cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.086

Wang, Hui, Zhao, L. N., Li, K. Z., Ling, R., Li, X. J., & Wang, L. (2006). Overexpression of ribosomal protein L15 is associated with cell proliferation in gastric cancer. *BMC Cancer*. https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-91

Wang, R., Yoshida, K., Toki, T., Sawada, T., Uechi, T., Okuno, Y., … Ito, E. (2015). Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *British Journal of Haematology*, *168*(6), 854–864. https://doi.org/10.1111/bjh.13229

Wang, S., Sakai, H., & Wiedmann, M. (1995). NAC covers ribosome-associated nascent chains thereby forming a protective environment for regions of nascent chains just emerging from the peptidyl transferase center. *Journal of Cell Biology*, *130*(3), 519–528. https://doi.org/10.1083/jcb.130.3.519

Waugh, R. E., Mckenney, J. B., Bauserman, R. G., Brooks, D. M., Valeri, C. R., & Snyder, L. M. (1997). Surface area and volume changes during maturation of reticulocytes in the circulation of the baboon. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *129*(5), 527–535. https://doi.org/10.1016/S0022-2143(97)90007-X

Weiss, M. J., & Santos, C. O. D. (2009). Chaperoning erythropoiesis. *Blood*, *113*(10), 2136–2144. https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-115238

Welch, W. J., & Suhan, J. P. (1986). Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. *Journal of Cell Biology*, *103*(5), 2035–2052. https://doi.org/10.1083/jcb.103.5.2035

Wells, G. R., Weichmann, F., Sloan, K. E., Colvin, D., Watkins, N. J., & Schneider, C. (2017). The ribosome biogenesis factor yUtp23/hUTP23 coordinates key interactions in the yeast and human pre-40S particle and hUTP23 contains an essential PIN domain. *Nucleic Acids Research*, *45*(8), 4796–4809. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1344

Wenger, R. H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O2-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O2-regulated gene expression. *FASEB Journal*, *16*(10), 1151–1162. https://doi.org/10.1096/fj.01-0944rev

West, M., Hedges, J. B., Chen, A., & Johnson, A. W. (2005). Defining the Order in Which Nmd3p and Rpl10p Load onto Nascent 60S Ribosomal Subunits. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(9), 3802–3813. https://doi.org/10.1128/mcb.25.9.3802-3813.2005

Wickner, S., Maurizi, M. R., & Gottesman, S. (1999). Posttranslational quality control: Folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, *286*(5446), 1888–1893. https://doi.org/10.1126/science.286.5446.1888

Williams, D. E., Eisenman, J., Baird, A., Rauch, C., Van Ness, K., March, C. J., … Lyman, S. D. (1990). Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell*, *63*(1), 167–174. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90297-R

Willig, T.-N., Draptchinskaia, N., Dianzani, I., Ball, S., Niemeyer, C., Ramenghi, U., … Tchernia, G. (1999). Mutations in Ribosomal Protein S19 Gene and Diamond Blackfan Anemia: Wide Variations in Phenotypic Expression. *Blood*, *94*(12), 4294–4306. https://doi.org/10.1182/blood.V94.12.4294.424k13_4294_4306

Willig, T. N., Pérignon, J. L., Gustavsson, P., Gane, P., Draptchinskaya, N., Testard, H., … Tchernia, G. (1998). High adenosine deaminase level among healthy probands of Diamond Blackfan Anemia (DBA) cosegregates with the DBA gene region on chromosome 19q13. *Blood*, *92*(11), 4422–4427.

Willig, Thiébaut Noël, Draptchinskaia, N., Dianzani, I., Ball, S., Niemeyer, C., Ramenghi, U., … Tchernia, G. (1999). Mutations in ribosomal protein S19 gene and Diamond Blackfan anemia: Wide variations in phenotypic expression. *Blood*, *94*(12), 4294–4306.

Willmund, F., Del Alamo, M., Pechmann, S., Chen, T., Albanèse, V., Dammer, E. B., … Frydman, J. (2013). The cotranslational function of ribosome-associated Hsp70 in eukaryotic protein homeostasis. *Cell*. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.001

Wilson, A., & Trumpp, A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature Reviews Immunology*, *6*(2), 93–106. https://doi.org/10.1038/nri1779

Wisniewski, D., Strife, A., & Clarkson, B. (1996). c-kit ligand stimulates tyrosine phosphorylation of the c-Cbl protein in human hematopoietic cells. *Leukemia*, *10*(9), 1436—1442. Retrieved from http://europepmc.org/abstract/MED/8751459

Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Silvennoinen, O., Yi, T., Tang, B., Miura, O., & Ihle, J. N. (1993). JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*, *74*(2), 227–236. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90414-L

Wlodarski, M. W., Da Costa, L., O'donohue, M. F., Gastou, M., Karboul, N., Montel-Lehry, N., … Macinnes, A. W. (2018). Recurring mutations in RPL15 are linked to hydrops fetalis and treatment independence in diamond-blackfan anemia. *Haematologica*. https://doi.org/10.3324/haematol.2017.177980

Woolford, J. L., & Baserga, S. J. (2013). Ribosome biogenesis in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*, *195*(3), 643–681. https://doi.org/10.1534/genetics.113.153197

Wu, C. Y., Lin, C. T., Wu, M. Z., & Wu, K. J. (2011). Induction of HSPA4 and HSPA14 by NBS1 overexpression contributes to NBS1-induced in vitro metastatic and transformation activity. *Journal of Biomedical Science*. https://doi.org/10.1186/1423-0127-18-1

Wu, H., Klingmöller, U., Besmer, P., & Lodish, H. F. (1995). Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature*, Vol. 377, pp. 242–246. https://doi.org/10.1038/377242a0

Wu, H., Klingmüller, U., Acurio, A., Hsiao, J. G., & Lodish, H. F. (1997). Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(5), 1806–1810. https://doi.org/10.1073/pnas.94.5.1806

Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., & Lodish, H. F. (1995). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*, *83*(1), 59–67. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90234-1

Xiao, W., Koizumi, K., Nishio, M., Endo, T., Osawa, M., Fujimoto, K., … Sawada, K. I. (2002). Tumor necrosis factor-α inhibits generation of glycophorin A+ cells by CD34+ cells. *Experimental Hematology*, *30*(11), 1238–1247. https://doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00930-X

Xiong, X., Zhao, Y., He, H., & Sun, Y. (2011). Ribosomal protein S27-like and S27 interplay with p53-MDM2 axis as a target, a substrate and a regulator. *Oncogene*. https://doi.org/10.1038/onc.2010.569

Xiong, Xiufang, Zhao, Y., Tang, F., Wei, D., Thomas, D., Wang, X., … Sun, Y. (2014). Ribosomal protein S27-like is a physiological regulator of p53 that suppresses genomic instability and tumorigenesis. *ELife*, *3*(August2014), 1–28. https://doi.org/10.7554/eLife.02236

Xu, J., Wang, Y., Guttorp, P., & Abkowitz, J. L. (2018). Visualizing hematopoiesis as a stochastic process. *Blood Advances*, *2*(20), 2637–2645. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018023705

Xu, P., Tong, Y., Liu, X. Z., Wang, T. T., Cheng, L., Wang, B. Y., … Liu, D. P. (2015). Both TALENs and CRISPR/Cas9 directly target the HBB IVS2-654 (C > T) mutation in β-thalassemiaderived iPSCs. *Scientific Reports*, *5*(April), 1–12. https://doi.org/10.1038/srep12065

Ya-Chieh Hsu, E. F. (2013). *A family business: stem cell progeny join the niche to regulate*. *70*(4), 646–656. https://doi.org/10.1002/ana.22528.Toll-like

Yadavilli, S., Mayo, L. D., Higgins, M., Lain, S., Hegde, V., & Deutsch, W. A. (2009). Ribosomal protein S3: A multi-functional protein that interacts with both p53 and MDM2 through its KH domain. *DNA Repair*, *8*(10), 1215–1224. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.07.003

Yaglom, J. A., Gabai, V. L., & Sherman, M. Y. (2007). High levels of heat shock protein Hsp72 in cancer cells suppress default senescence pathways. *Cancer Research*, *67*(5), 2373–2381. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3796

Yamamoto, R., Morita, Y., Ooehara, J., Hamanaka, S., Onodera, M., Rudolph, K. L., … Nakauchi, H. (2013). Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell*, *154*(5), 1112–1126. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.007

Yamasaki, T., Takahashi, A., Pan, J., Yamaguchi, N., & Yokoyama, K. K. (2009). Phosphorylation of activation transcription factor-2 at serine 121 by protein kinase C controls c-Jun-mediated activation of transcription. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(13), 8567–8581. https://doi.org/10.1074/jbc.M808719200

Yamazaki, S., Ema, H., Karlsson, G., Yamaguchi, T., Miyoshi, H., Shioda, S., … Nakauchi, H. (2011). Nonmyelinating schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the

bone marrow niche. *Cell*, *147*(5), 1146–1158. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.053

Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B., & Korsmeyer, S. J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-x L and Bcl-2, displaces bax and promotes cell death. *Cell*. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90411-5

Yang, Z., Zhuang, L., Szatmary, P., Wen, L., Sun, H., Lu, Y., … Chen, X. (2015). Upregulation of heat shock proteins (HSPA12A, HSP90B1, HSPA4, HSPA5 and HSPA6) in tumour tissues is associated with poor outcomes from HBV-related early-stage hepatocellular carcinoma. *International Journal of Medical Sciences*. https://doi.org/10.7150/ijms.10735

Yarden, Y., Kuang, W. J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T. J., … Ullrich, A. (1987). Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *The EMBO Journal*, *6*(11), 3341–3351. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02655.x

Yi, L., Li, Z., Hu, T., Liu, J., Li, N., Cao, X., & Liu, S. (2019). Intracellular HSP70L1 inhibits human dendritic cell maturation by promoting suppressive H3K27me3 and H2AK119Ub1 histone modifications. *Cellular and Molecular Immunology*, (December), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41423-018-0195-8

Yip, R., Johnson, C., & Dallman, P. R. (1984). Age-related changes in laboratory values used in the diagnosis of anemia and iron deficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*, *39*(3), 427–436. https://doi.org/10.1093/ajcn/39.3.427

Yokota, T. (2019). *"Hierarchy" and "Holacracy"; A Paradigm of the Hematopoietic System*. 1–10.

Yoon, S. Y., Kim, J. M., Oh, J. H., Jeon, Y. J., Lee, D. S., Kim, J. H., … Kim, N. S. (2006). Gene expression profiling of human HBV- and/or HCV-associated hepatocellular carcinoma cells using expressed sequence tags. *International Journal of Oncology*, *29*(2), 315–327. https://doi.org/10.3892/ijo.29.2.315

Yoshida, H., Kawane, K., Koike, M., Mori, Y., Uchiyama, Y., & Nagata, S. (2005). Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature*, *437*(7059), 754–758. https://doi.org/10.1038/nature03964

Yoshimura, A., Zimmers, T., Neumann, D., Longmore, G., Yoshimura, Y., & Lodish, H. F. (1992). Mutations in the Trp-Ser-X-Trp-Ser motif of the erythropoietin receptor abolish processing, ligand binding, and activation of the receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(16), 11619–11625.

Youssoufian, H., Longmore, G., Neumann, D., Yoshimura, A., & Lodish, H. (1993). Structure, function, and activation of the erythropoietin receptor. *Blood*, *81*(9), 2223–2236. https://doi.org/10.1182/blood.V81.9.2223.bloodjournal8192223

Yu, V. W. C., Yusuf, R. Z., Oki, T., Wu, J., Saez, B., Wang, X., … Scadden, D. T. (2016). Epigenetic Memory Underlies Cell-Autonomous Heterogeneous Behavior of Hematopoietic Stem Cells. *Cell*, *167*(5), 1310-1322.e17. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.045

Yu, X., Shacka, J. J., Eells, J. B., Suarez-Quian, C., Przygodzki, R. M., Beleslin-Cokic, B., … Noguchi, C. T. (2002). Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development*, *129*(2), 505–516.

Yusupova, G., & Yusupov, M. (2014). High-Resolution Structure of the Eukaryotic 80S Ribosome. *Annual Review of Biochemistry*, *83*(1), 467–486. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035445

Yuzawa, S., Opatowsky, Y., Zhang, Z., Mandiyan, V., Lax, I., & Schlessinger, J. (2007). Structural Basis for Activation of the Receptor Tyrosine Kinase KIT by Stem Cell Factor. *Cell*, *130*(2), 323–334. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.055

Zamai, L., Secchiero, P., Pierpaoli, S., Bassini, A., Papa, S., Alnemri, E. S., … Zauli, G. (2000). *TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human*

erythropoiesis. *95*(12), 3716–3724.

Zanni, G., Kalscheuer, V. M., Friedrich, A., Barresi, S., Alfieri, P., Di Capua, M., … Breitenbach-Koller, L. (2015). A Novel Mutation in RPL10 (Ribosomal Protein L10) Causes X-Linked Intellectual Disability, Cerebellar Hypoplasia, and Spondylo-Epiphyseal Dysplasia. *Human Mutation*. https://doi.org/10.1002/humu.22860

Zavialov, A. V., & Engström, Å. (2005a). Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. *Biochemical Journal*, *391*(1), 51–57. https://doi.org/10.1042/bj20050683

Zavialov, A. V., & Engström, Å. (2005b). Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. *Biochemical Journal*, Vol. 391, pp. 51–57. https://doi.org/10.1042/bj20050683

Zavialov, A. V., Gracia, E., Glaichenhaus, N., Franco, R., Zavialov, A. V., & Lauvau, G. (2010). Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, *88*(2), 279–290. https://doi.org/10.1189/jlb.1109764

Zavialov, Anton V., Yu, X., Spillmann, D., Lauvau, G., & Zavialo, A. V. (2010). Structural basis for the growth factor activity of human adenosine deaminase ADA2. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(16), 12367–12377. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.083527

Zeng, Y., & Cullen, B. R. (2004). *Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5*. *32*(16), 4776–4785. https://doi.org/10.1093/nar/gkh824

Zermati, B. Y., Garrido, C., Amsellem, S., Fishelson, S., Bouscary, D., Valensi, F., … Hermine, O. (2001). *Caspase Activation Is Required for Terminal Erythroid Differentiation*. *193*(2), 247–254.

Zermati, Y., De Sepulveda, P., Féger, F., Létard, S., Kersual, J., Castéran, N., … Dubreuil, P. (2003). Effect of tyrosine kinase inhibitor STI571 on the kinase activity of wild-type and various mutated c-kit receptors found in mast cell neoplasms. *Oncogene*. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206120

Zermati, Y., Fichelson, S., Valensi, F., Freyssinier, J. M., Rouyer-Fessard, P., Cramer, E., … Hermine, O. (2000). Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors. *Experimental Hematology*, *28*(8), 885–894. https://doi.org/10.1016/S0301-472X(00)00488-4

Zhang, D., Cui, Y., Li, B., Luo, X., Li, B., & Tang, Y. (2017). A comparative study of the characterization of miR-155 in knockout mice. *PLoS ONE*, *12*(3), 1–17. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173487

Zhang, J., Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Tang, L., Guo, Y., Oeffinger, M., … Woolford, J. L. (2007). Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recruit 5S rRNA and ribosomal proteins rpL5 and rpL11 into nascent ribosomes. *Genes and Development*, *21*(20), 2580–2592. https://doi.org/10.1101/gad.1569307

Zhang, Liman, Wu, C., Cai, G., Chen, S., & Ye, K. (2016). Stepwise and dynamic assembly of the earliest precursors of small ribosomal subunits in yeast. *Genes and Development*. https://doi.org/10.1101/gad.274688.115

Zhang, Lingbo, Prak, L., Rayon-Estrada, V., Thiru, P., Flygare, J., Lim, B., & Lodish, H. F. (2013). ZFP36L2 is required for self-renewal of early burst-forming unit erythroid progenitors. *Nature*, *499*(7456), 92–96. https://doi.org/10.1038/nature12215

Zhang, W., Hui, K. Y., Gusev, A., Warner, N., Ng, S. M. E., Ferguson, J., … Cho, J. H. (2013). Extended haplotype association study in Crohn's disease identifies a novel, Ashkenazi Jewish-specific missense mutation in the NF-κB pathway gene, HEATR3. *Genes and Immunity*, *14*(5), 310–316. https://doi.org/10.1038/gene.2013.19

Zhang, X. L., Gao, F., Li, W., Tang, W. Z., & Zhang, S. (2015). Serial analysis of gene expression in adenocarcinoma samples and normal colonic mucosa in a Chinese

population. *Genetics and Molecular Research*, *14*(4), 12903–12911. https://doi.org/10.4238/2015.October.21.11

Zhang, X., Wang, W., Wang, H., Wang, M.-H., Xu, W., & Zhang, R. (2013). Identification of ribosomal protein S25 (RPS25)-MDM2-p53 regulatory feedback loop. *Oncogene*, *32*(22), 2782–2791. https://doi.org/10.1038/onc.2012.289

Zhang, Yanyan, Dépond, M., He, L., Foudi, A., Kwarteng, E. O., Lauret, E., … Wittner, M. (2016). CXCR4/CXCL12 axis counteracts hematopoietic stem cell exhaustion through selective protection against oxidative stress. *Scientific Reports*, *6*(November), 1–13. https://doi.org/10.1038/srep37827

Zhang, Ying, Wang, J., Yuan, Y., Zhang, W., Guan, W., Wu, Z., … He, F. (2010). Negative regulation of HDM2 to attenuate p53 degradation by ribosomal protein L26. *Nucleic Acids Research*, *38*(19), 6544–6554. https://doi.org/10.1093/nar/gkq536

Zhang, Z., Zhang, R., Joachimiak, A., Schlessinger, J., & Kong, X.-P. (2000). Crystal structure of human stem cell factor: Implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(14), 7732–7737. https://doi.org/10.1073/PNAS.97.14.7732

Zhao, M., Perry, J. M., Marshall, H., Venkatraman, A., Qian, P., He, X. C., … Li, L. (2014). Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nature Medicine*, *20*(11), 1321–1326. https://doi.org/10.1038/nm.3706

Zhou, B. O., Yu, H., Yue, R., Zhao, Z., Rios, J. J., Naveiras, O., & Morrison, S. J. (2017). Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. *Nature Cell Biology*. https://doi.org/10.1038/ncb3570

Zhou, Q., Yang, D., Ombrello, A. K., Zavialov, A. V., Toro, C., Zavialov, A. V., … Aksentijevich, I. (2014). Early-onset stroke and vasculopathy associated with mutations in ADA2. *New England Journal of Medicine*. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1307361

Zhou, X., Hao, Q., Liao, J., Zhang, Q., & Lu, H. (2013). Ribosomal protein S14 unties the MDM2-p53 loop upon ribosomal stress. *Oncogene*. https://doi.org/10.1038/onc.2012.63

Zon, L. I., Yamaguchi, Y., Yee, K., Albee, E. A., Kimura, A., Bennett, J. C., … Ackerman, S. J. (1993). Expression of mRNA for the GATA-binding proteins in human eosinophils and basophils: Potential role in gene transcription. *Blood*, *81*(12), 3234–3241.

Zon, L. I., Youssoufian, H., Mather, C., Lodish, H. F., & Orkin, S. H. (1991). Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(23), 10638–10641. https://doi.org/10.1073/pnas.88.23.10638

Zsebo, K. M., Williams, D. A., Geissler, E. N., Broudy, V. C., Martin, F. H., Atkins, H. L., … Suggs, S. V. (1990). Stem cell factor is encoded at the SI locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell*, *63*(1), 213–224. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90302-U

Zumkeller, W., Sääf, M., Rahn, T., & Hall, K. (1991). Demonstration of insulin-like growth factors i, ii and heterogeneous insulin-like growth factor binding proteins in the cyst fluid of patients with craniopharyngioma. *Neuroendocrinology*, *54*(3), 196–201. https://doi.org/10.1159/000125876

ANNEXE 1

Annexes

A Small Nucleolar RNA Linked to Diamond-Blackfan Anemia

Adeline Mayeux, Nathalie Montel-Lehry, **Manon Saby**, Aurore Anton, Narjesse Karboul, Julie Galimand, Helene Bourdeau, Jonathan Levy, Anne-claude Tabet, Mohandas Narla, Alyson W. MacInnes, Pascale Dufourcq, Patrick Blader, Thierry Leblanc, Marie-francoise O' Donohue, Pierre-Emmanuel Gleizes, Lydie Da Costa;

Blood (2018) https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-110663

Diamond-Blackfan anemia (DBA) is a rare congenital erythroblastopenia associated with haploinsufficiency of more than 15 ribosomal protein genes. We identified in the French registry a DBA patient exhibiting a large heterozygous deletion in ribosomal protein gene *RPSA*, making it a new candidate as a DBA-associated gene. The deletion was confirmed by qPCR using specific intron/exon primers that could discriminate the *RPSA* gene from pseudo-genes. Consistent loss of function of this allele, *RPSA* mRNAs were underrepresented in erythroid cultures and in lymphoblastoid cells (LCLs) derived from the patient. Additionally, an important decrease in erythroid proliferation was observed in erythroid progenitor and precursor cells derived from the patient's bone marrow $CD34^+$ cells, together with a delay in erythroid differentiation, the activation of the p53 pathway, and a G_0/G1 cell cycle arrest, which are regular features of DBA patient cells. Similar to other RP genes linked to DBA, interruption of *RPSA* expression in zebrafish embryos strongly affected development of the head and erythroid cell differentiation, supporting its relevance as a candidate DBA gene. Northern blot analysis also revealed impaired pre-ribosomal RNA (pre-rRNA) processing in patient LCLs compared to controls. But unexpectedly, the observed pre-rRNA profile was clearly different from that observed in HeLa cells upon *RPSA* knockdown and suggested a dysfunction of pre-rRNA processing upstream of that produced by a shortage of RPSA. We noticed that the *RPSA* gene hosts the intron-encoded H/ACA snoRNAs snoRA6 and snoRA62, the latter being included in the deletion. Q-RT-PCR analysis of patient cells showed decreased levels of snoRA62 when compared to controls and to other RP-mutated DBA patients. Strikingly, knocking out the snoRNA62 coding sequence in human haploid HAP1 cells with Crispr/Cas9 resulted in a pre-rRNA maturation defect similar to that observed in the $RPSA^{+/mut}$ DBA patient, thereby revealing a role for snoRA62 in human pre-rRNA processing. These data strongly suggest that, in addition to *RPSA* haploinsufficiency, the *primum movens* of DBA in this particular patient includes the deletion of the intronic snoRA62 hosted in the *RPSA* gene. To our knowledge, this is the first time that a snoRNA is linked to DBA. We will discuss this ongoing work in light of our most recent results in cells and zebrafish models.

Annexes

ANNEXE 2

Annexes

Identification and Functional Studies of New Candidate Genes in Diamond-Blackfan Anemia

M. Saby[1,2,3] M. Nehlich[1,3], A. Mayeux[1,3], J. Galimand[8], T. Leblanc[4], P. Cougoul[5], M. Wlodarski[6], MF. O'Donohue[7,8], PE. Gleizes[7,8], L. Da Costa[1,2,3,9]

[1]Inserm U1134, National Institute of Blood Transfusion, Paris, 75015, France
[2]University Paris 7 – Denis Diderot, Paris 75015, France
[3]GR-Ex Labex, Paris
[4]Pediatric Onco-Hematology Service, Hospital Robert Debré, Paris, 75019, France
[5]Internal Medicine Service, University Cancer Institute of Toulouse, 31059, France
[6]Pediatric Hematology and Oncology, University Children's Hospital Freiburg, Freiburg, 79106, Germany
[7]Inserm U5099 – Molecular Biology laboratory of adenovirus, Toulouse, 31062, France
[8]University Toulouse III – Paul Sabatier, Toulouse, 31062, France
[9]Biological Hematology Service, Hospital Robert Debré, Paris, 75019, France

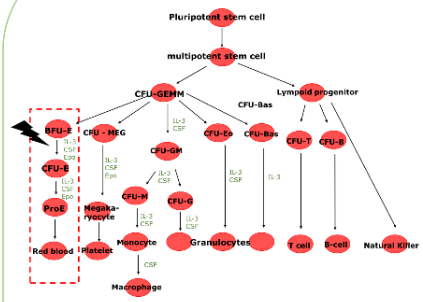
INTRODUCTION

Diamond-Blackfan anemia (DBA) is a rare congenital erythroblastopenia (7 cases per million live birth/year). Although very heterogeneous, the disease is mostly revealed at the age of 2 month-old. DBA is characterized by an aregenerative anemia, usually macrocytic . In 40% of DBA cases, the anemia is associated with various congenital malformations, preferentially affecting the cephalic area and the extremities (triphalangeal thumbs, duplication or bifid thumbs, etc…) (*Willig, pediatric res, 1998 & Vlachos, Br J Haematol, 2008*). The blockade of the erythroid differentiation has been identified between the EPO-independent stage (BFU-e) and the EPO-dependent stage (CFU-e) (*Ohene-Abuakwa, Blood, 2005*), from which erythroblastopenia is defined by the absence or less than 5% of erythroid precursors within an otherwise normocellular bone marrow.

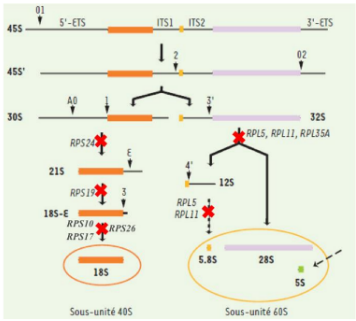
In ~80% of cases, an heterozygous mutation is found in a ribosomal protein (RP) gene. To date, 23 ribosomal protein genes have been identified and involved in the occurrence of DBA, involving both the small (RPS19 (25% of cases), RPS10 (3%), RPS26 (7%) …) and the large ribosomal subunit (RPL5 (7% of cases), RPL11 (5%), RPL35a (3%) …). The mutation in a RP gene leads to a defect in rRNA maturation (*Ellis & Gleizes, JBC, 2005*). DBA is considered as a ribosomopathy and has been the first disease related to a ribosome biogenesis impairment.

In the 20% of DBA cases remaining with no identified genotype, we made the hypothesis that some patients may carry a mutation in new candidate gene(s). We explored these patients and their parents (trios) by exome sequencing and identified indeed new genes involved in the disease.

DBA : Blockade in erythroid differentiation



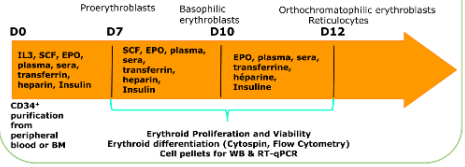
DBA : Defect in rRNA maturation



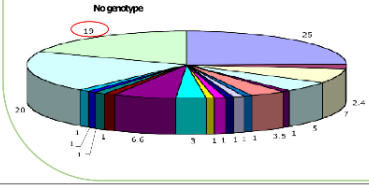
Erythroid cell Culture method

in liquid culture medium

Hu et al., Blood 2013

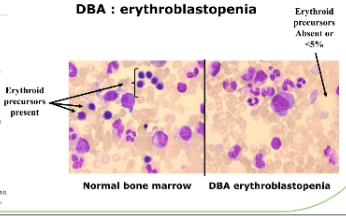


DBA GENOTYPE



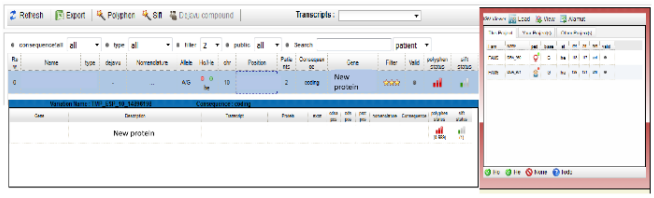


DBA : erythroblastopenia

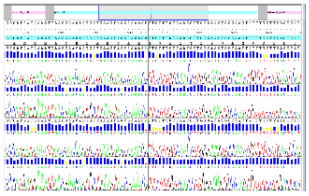


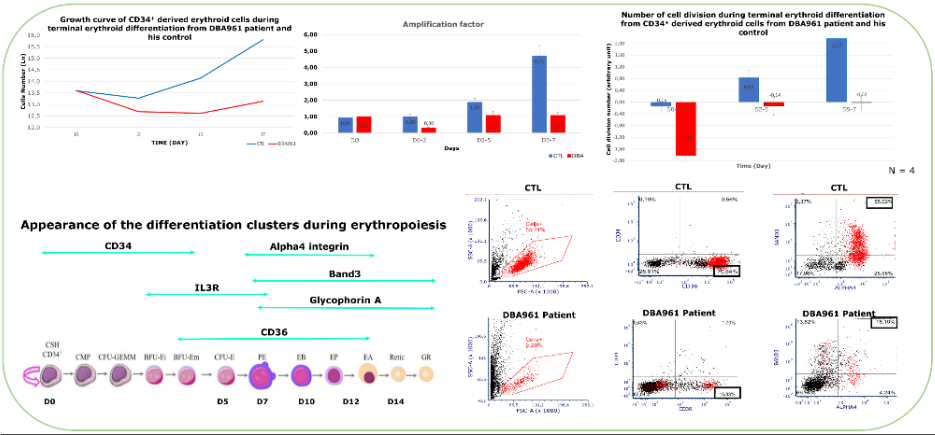
IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL STUDY OF NEW GENES

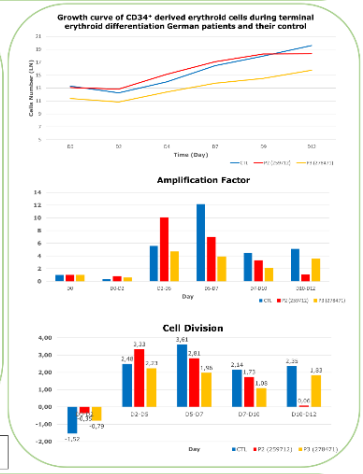
EXOME ANALYSES



SANGER ANALYSES



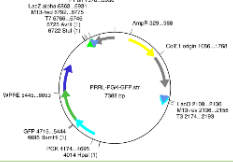




GENE INHIBITION METHOD

shRNA technology

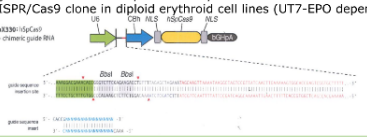
We chose two different shRNAs per new candidate gene(s) and are in the process of cloning each of them in a pRRL-PGK-GFP lentiviral after a PH1 cloning.



CRISPR/Cas9 technology

We identified a new candidate gene in a particular DBA patient and in parallel of specific shRNAs generation to invalidate the gene, we are using the CRISPR/Cas9 technology.

We collaborate with a group in Toulouse (MF. O'Donohue and PE. Gleizes) who has generated a CRISPR/Cas9 clone invalidating the new candidate gene identified in this patient. They have validated the efficient clone in yeast and we are in the process of testing this CRISPR/Cas9 clone in diploid erythroid cell lines (UT7-EPO dependent cells).



CONCLUSION AND PERSPECTIVES

We identified out of 17 probands affected with DBA (51 trios) without any characterized genotype so far (no mutation in any of the 23 RP genes, and *TSR2* and *GATA1* genes), 8 new candidate genes, which have been identified by exome sequencing (Imagine plateform, LABEX GR-Ex, Hôpital Necker) and validated by Sanger technique. We have not identified the mutation in both parents reinforcing the pathogenicity of these genes and their role in the disease since the DBA inheritance is mostly sporadic. We are in the process of performing functional experiments in order to confirm the role of these new genes in DBA pathophysiology. We hope that these candidate genes will open new signaling pathways involved in the disease and that we will make large progress in deciphering the 20% remaining patients with no genotype yet.

BIBLIOGRAPHIE

T-N.Willing et al. Identification of New Prognosis Factors from the Clinical and Epidemiologic Analysis of a Registry of 229 Diamond-Blackfan Anemia Patients. pediatric res. 1998.

A.Vlachos et al. Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference. Br J Haematol. 2008

Y. Ohene-Abuakwa et al. Two-phase culture in Diamond Blackfan anemia: localization of erythroid defect. Blood.2005

SR. Ellis & PE Gleizes. Diamond Blackfan anemia: ribosomal proteins going rogue. Semin Hematol.2011