

FATOUMATA KORIKA TOUNKARA

**ÉTUDE DES EFFETS DE L'HYPERTHERMIE LÉGÈRE SUR LA
PROLIFÉRATION ET LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES SOUCHES
HÉMATOPOÏÉTIQUES CD34⁺ ISSUES DU SANG DE CORDON OMBILICAL**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Biochimie
pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc)

DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET DE MICROBIOLOGIE
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2010

© Fatoumata Korika Tounkara, 2010

Résumé

L'érythropoïèse est un mécanisme complexe responsable de la formation des érythrocytes à partir des cellules souches hématopoïétiques. Notre équipe a précédemment montré que l'hyperthermie légère favorise l'expansion et accélère la différenciation des cellules mégacaryocytes en culture. Le but de mes travaux était de caractériser les effets de l'hyperthermie légère sur les autres voies de différenciation myéloïdes (cellules érythroïdes, granulocytes et monocytes) et d'identifier les mécanismes d'action responsables des effets observés sur l'érythropoïèse. Nous montrons que l'hyperthermie légère permet un accroissement de l'expansion sur la majorité des lignées testées et accélère leur différenciation et maturation. De plus, nos résultats montrent que l'hyperthermie légère favorise une entrée rapide des cellules CD34⁺ quiescentes en cycle cellulaire et augmente l'expression de plusieurs protéines de choc thermique. En conclusion, nos résultats suggèrent que les effets observés de l'hyperthermie légère sur l'érythropoïèse sont en partie dus à l'activation de plusieurs sentiers de signalisation intracellulaire ainsi que du facteur proérythrocytaire GATA-1.

Avant-Propos

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Dr. Nicolas Pineault pour avoir accepté de diriger ce mémoire et pour m'avoir soutenu tout au long de sa rédaction. Sincères remerciements et profonde reconnaissance.

Mes remerciements s'adressent également aux membres de mon comité aviseur, Dr Renée Bazin, Dr Sonia Néron et Dr André Darveau qui ont toujours fait preuve de disponibilité, de soutien et de pragmatisme.

Merci à l'ensemble de mes collègues du département de Recherche & Développement, en particulier à Lucie Boyer et Carl Simard qui m'ont aidé tout au long de mon projet, ainsi qu'aux autres étudiants chercheurs avec lesquels j'ai eu un réel plaisir à échanger et travailler. Je tiens également à remercier Claire Gauthier, qui m'a toujours accueillie avec sourire et gentillesse. Pour finir, je voudrais également remercier Héma-Québec pour le soutien financier pendant toute la durée de ma maîtrise.

Merci à l'ensemble des professeurs du département de chimie-biologie de l'Université du Québec à Trois-Rivières et aussi l'ensemble des professeurs du département de Biochimie-microbiologie de l'Université Laval, en particulier Dr Louise Brisson, avec lesquels j'ai eu à suivre des cours et travaux pratiques qui ont contribué à l'amélioration de mes connaissances scientifiques.

Je remercie également Lise et Denis Bellefeuille ainsi que Brenda Randolph qui ont été comme des parents pour moi. Durant toutes mes études à Trois-Rivières, Québec ainsi que durant mon immersion en Anglais à Washington DC, avec eux, je ne me suis jamais sentie seule ou sentie le besoin d'être avec mes parents, car ils ont toujours été présents pour me soutenir dans des moments parfois difficiles. Pour terminer, je remercie mes deux compatriotes et meilleurs amis Dr Mamadou Lamine Doumbia, Dr Moussa Zéro et Djibril Tall pour leur soutien et encouragement.

*Je dédie ce mémoire à toute ma famille, ma mère Djénèbou Diarra, mes frères et sœurs pour leur soutien et encouragement, et plus particulièrement à mon défunt père **Seydou Tounkara** ; qui a été pour moi un magnifique modèle de labeur et de persévérance trouve ici toute ma gratitude, ma reconnaissance et mon amour éternel.*

Table des matières

Résumé.....	i
Avant-Propos	ii
Table des matières	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations.....	ix
1 . Introduction.....	12
1.1 . Importance des cellules souches hématopoïétiques (CSHs).....	12
1.2 . Hématopoïèse.....	12
1.2.1 . Régulation de l'hématopoïèse.....	15
1.3 . L'érythroïèse.....	17
1.3.1 . Biochimie et fonction physiologique des globules rouges	19
1.3.2 . La régulation de l'érythroïèse par GATA-1	19
1.3.3 . Rôle de GATA-1 dans la régulation du cycle cellulaire	21
1.3.4 . La régulation de l'érythroïèse par STAT5a/b	21
1.3.5 . La maturation terminale et l'énucléation des érythrocytes.....	23
1.3.6 . Le récepteur de l'érythropoïétine.....	24
1.4 . Culture des globules rouges <i>ex vivo</i>	28
1.4.1 . La synergie entre l'érythropoïétine et Stem Cell Factor.....	28
1.4.2 . Différents travaux pour la culture des globules rouges <i>ex vivo</i>	29
1.5 . Lignée UT-7/EPO	30
1.6 . La granulopoïèse et monocytopoïèse.....	31
1.7 . Effet de l'hyperthermie légère sur la mégacaryopoïèse.....	33
1.8 . Rôle des protéines de choc thermique dans l'érythroïèse.....	35
1.9 . Mécanisme de la maturation des cellules érythroïdes à 39°C.....	38
1.10 . Effet biologique et moléculaire de l'hyperthermie légère	39
1.11 . Modulation des voies JAK/STAT, PI3K/AKT et ERK1/2 à 39 °C.....	40
1.12 Problématique du projet de recherche	42
1.12.1 . Hypothèse générale et objectifs des travaux.....	43
2 . Matériel et méthodes.....	45
2.1 . Cellules souches hématopoïétiques (CSHs)	45
2.1.1 . Échantillons de sang de cordon ombilical	45
2.1.2 . Isolement des cellules mononuclées à partir du sang de cordon	45
2.1.3 . Enrichissement des MNCs en cellules CD34 ⁺	46
2.2 . Culture cellulaire.....	46
2.2.1 . Culture de cellules CD34 ⁺	46
2.2.2 . Mise en culture des cellules CD34 ⁺ au jour zéro.....	47
2.2.3 . Compte de cellules, évaluation de la viabilité et dilution	48
2.2.4 . Lignée cellulaire érythroleucémique (UT-7/EPO)	48
2.2.5 . Analyse en cytométrie en flux	48
2.2.6 . Coloration des cellules au Wright GIEMSA	49
2.2.7 . Expansion des progéniteurs hématopoïétiques	50
2.2.8 . Analyse du cycle cellulaire	50

2.3 . Les voies JAK/STAT5a/b, PI3K/AKT et MEK/ERK1/2	50
2.3.1 . Inhibition des voies de JAK/STAT, PI3K/AKT et MEK/ERK1/2.....	52
2.4 . Extraits protéiques	53
2.4.1 . Dosage des protéines par la méthode de Bradford	54
2.4.2 . Analyse des protéines par immunobuvardage	54
2.5 . Analyse de l'activité transcriptionnelle de GATA-1	55
2.5.1 . Transformation bactérienne par électroporation.....	56
2.5.2 . Mini-préparation et Midi-préparation d'ADN plasmidique	56
2.5.3 . Congélation de la culture bactérienne.....	56
2.5.4 . Digestion avec les enzymes de restriction	57
2.5.5 . Électroporation des cellules UT-7/EPO.....	57
2.5.6 . Essai de la luciférase.....	57
2.6 . Analyse statistique	58
2.7 . Calcul de la proportion de cellules à GPA+ à 39 °C	58
2.8 . Calcul de perte de l'effet de l'HL sur la différenciation.....	58
3 . Résultats.....	59
3.1 . Impact de l'hyperthermie légère sur l'érythropoïèse.....	59
3.1.1 . Impact à 39°C sur l'expansion des cellules érythrocytaires	59
3.1.2 . Impact à 39 °C sur la différenciation des cellules érythroïdes	62
3.1.3 . Impact à 39°C sur la maturation des cellules érythrocytaires.....	64
3.1.4 . Impact à 39°C sur l'entrée en cycle cellulaire des cellules CD34 ⁺	67
3.2 . Mécanisme potentiellement impliqué à 39°C sur l'érythropoïèse.....	69
3.2.1 . Modulation des voies JAK/STAT, PI3K/AKT et ERK1/2 à 39 °C.....	71
3.2.2 . Impact des inhibiteurs JAK/STAT, PI3K/AKT et MEK/ERK1/2.....	74
3.2.3 . Impact à 39 °C sur le niveau d'expression des HSPs	78
3.2.4 . Impact à 39 °C sur le niveau l'expression de GATA-1	80
3.2.5 . Impact a 39 °C sur l'activité transcriptionnelle de GATA-1	81
3.3 . Impact à 39 °C sur la granulopoïèse	83
3.3.1 . Impact à 39 °C sur la maturation des cellules granulocytaires	84
3.4 . Impact à 39°C sur la monocytopoïèse.....	86
3.4.1 . Impact à 39 °C sur la maturation des cellules monocytaires	87
3.5 . Impact à 39 °C sur l'expansion des progéniteurs myéloïdes	88
4 Discussion	90
4.1 . Impact à 39°C sur l'expansion et la différenciation des diverses lignées de la voie myéloïde.....	90
4.2 . Impact à 39 °C sur l'érythropoïèse	91
4.2.1 . Impact à 39 °C sur la prolifération et le cycle cellulaire des cellules érythroïdes	93
4.3 . Mécanismes possiblement responsables des effets à 39 °C sur la différenciation des cellules érythroïdes.....	94
4.3.1 . Impact à 39 °C sur les molécules de signalisation et sur GATA-1.....	94
4.3.2 . Régulation du niveau d'expression des HSPs à 39 °C	99
4.4 . Comparaison des résultats des effets à 39°C sur l'érythropoïèse et mégacaryopoïèse.....	101
4.5 . Comparaison des résultats des effets à 39°C sur l'expansion des cellules granulocytaires et monocytaires	103

5 . Conclusion	106
6 Bibliographie	108

Liste des tableaux

Tableau 3.1 : Perte de l'effet de l'hyperthermie légère ^A en présence des différents inhibiteurs (MOY \pm ET, n=2).....	78
--	----

Liste des figures

Figure 1.1: Hématopoïèse chez l'homme	14
Figure 1.2: Schéma général de l'érythropoïèse	18
Figure 1.3: Complexe GATA-1/FOG-1	20
Figure 1.4 : Activation des STATs par différentes cytokines.....	22
Figure 1.5: Étapes successives de la maturation des cellules érythroïde.....	24
Figure 1.6: Cascade de signalisation suite à l'activation d'EPO-R par EPO.	27
Figure 1.7: Cycle de régulation de l'érythropoïétine par le rein.....	28
Figure 1.8: Vue d'ensemble de la granulopoïèse et monocytopoïèse.....	33
Figure 1.9: Co-localisation nucléaire de GATA-1 et Hsp70	36
Figure 1.10: Régulation de l'apoptose par les HSPs.	37
Figure 1.11 : Les voies potentiellement activées par l'hyperthermie légère	38
Figure 1.12: Effet de l'hyperthermie légère sur l'activation de Ras/MAPK.	40
Figure 1.13: Modèle de régulation des voies JAK/STAT, PI3K/AKT et MEK/ERK1/2 par l'hyperthermie légère.....	41
Figure 2.1: Principe de coloration au CFSE	52
Figure 3.1: Impact à 39 °C sur l'expansion des cellules de la lignée érythrocytaire.....	61
Figure 3.2: Impact à 39 °C sur la différenciation des cellules érythroïdes.....	63
Figure 3.3: Impact à 39 °C sur la maturation des cellules érythroïdes	66
Figure 3.4: Impact à 39 °C sur le cycle cellulaire des cellules érythroïdes	68
Figure 3.5: Protocoles expérimentaux à 39°C à court terme (15 minutes et une 1 h) et à moyen terme (o/n) des cellules en condition érythroïdes.	70
Figure 3.6: Impact à 39 °C sur la phosphorylation de STAT5a/b, AKT et ERK1/2	73
Figure 3.7: Protocoles de culture I et III pour les tests d'inhibiteurs.....	75
Figure 3.8: Impact à 39 °C sur l'expression de la GPA, après inhibition des voies JAK/STAT, PI3K/AKT et MEK/ERK1/2	77
Figure 3.9: Impact de l'hyperthermie légère sur le niveau d'expression des HSPs.	80
Figure 3.10 : Impact à 39 °C sur le niveau d'expression de GATA-1 (pS310).....	81
Figure 3.11 : Impact à 39 °C sur l'activité transcriptionnelle de GATA-1.	82
Figure 3.12: Impact à 39 °C sur l'expansion des cellules de la lignée granulocytaire	83
Figure 3.13: Impact à 39 °C sur la maturation des cellules granulocytaires	85
Figure 3.14: Impact à 39 °C sur l'expansion des cellules de la lignée monocytaire	86
Figure 3.15: Impact à 39 °C sur la maturation des cellules de la lignée monocytaire.....	87
Figure 3.16: Impact à 39 °C sur l'expansion des progéniteurs myéloïdes	89
Figure 4.1 : Processus cellulaire régulé par P38/MAPK	98
Figure 4.2 : Voie de signalisation activée par la thrombopoïétine	103

Liste des abréviations

A :	Alanine
ADN :	Acide Déoxyribonucléique
APC :	Allophycocyanine
ARN :	Acide Ribonucléique
BFU-E :	Burst Forming Unit Erythrocyte
CDxx :	Cluster of Differentiation antigen
CFU-E, GM :	Colony Forming Unit Erythrocyte, Granulocyte / Monocyte»
C/EBP α :	CCAAT/Enhance Binding Protein α
CDK:	Cyclin Dependant Kinase
CFSE:	Carboxy Fluorescein Diacetate Succinimidyl Ester
CLP :	common lymphoid progenitor
CKI :	Cyclin Kinase Inhibitor
CMP :	Common Myeloid Progenitor
CSH :	Cellule Souche Hématopoïétique
D :	Acide aspartique
DBD :	DNA Binding Domain
EGF :	Epidermal growth factor
EPO :	Érythropoïétine
EPO-R :	Erythropoietin Receptor
ERK1/2 :	Extracellular signal Regulated Kinase1/2
ESC:	Embryonic Stem Cell
ETM:	Écart-Type Moyen
F :	Phénylalanine
FITC :	Fluorescéine Isothiocyanate
FL :	Flt3 Ligand
FOG-1 :	Friend Of GATA-1
G0 :	Phase Gap 0 du cycle cellulaire (quiescence)
G1 :	Phase Gap 1 du cycle cellulaire
G2 :	Phase Gap 2 du cycle cellulaire

G-CSF :	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
G-CSF-R :	Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor
GM-CSF:	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
GMP :	Granulocyte / Macrophage Progenitor
GPA :	Glycophorine A
HESC :	Human Embryonic Stem Cell
HOXB4:	Homeobox protein Hox-B4
HSP :	Heat-Shock Protein
IGF :	Insulin-like Growth Factor
IL :	Interleukine
JAK :	Janus Kinase family
M :	Mitose
MAPK :	Mitogen-Activated Protein Kinase
M-CSF :	Macrophage Colony-Stimulating Factor
M-CSF-R :	Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor
MEP :	«Megakaryocyte / Erythrocyte Progenitor»
NF-E2:	Nuclear Factor Erythroid-derived 2
MK :	Mégacaryocyte
MNC :	«Mononucleated Cells»
MOY:	Moyenne
NK :	Natural Killer
PBMC :	Peripheral Blood Mobilized Cell
PE :	Phycoérythrine
PI3K :	Phosphoinositide 3-kinase
PKB :	Protéin Kinase B
RB :	Rétinoblastome
S :	Phase de synthèse de l'ADN du cycle cellulaire
SC :	Sang de Cordon
SCF :	Stem Cell Factor
ShRNA:	Small hairpin RNA or Short hairpin RNA
STAT :	Signal Transducer and Activator of Transcription

T :	Thréonine
TNC :	Total Nucleated Cells
TPO :	Thrombopoïétine
VCAM-1 :	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VIH :	Virus Immunodéficiencie Humaine
W :	Tryptophane
Y :	Tyrosine

1. Introduction

1.1. Importance des cellules souches hématopoïétiques (CSHs)

Depuis la nuit des temps, l'être humain a toujours été à la recherche de nouveaux moyens de prévenir et de traiter les maladies qui l'affligent. Par leur capacité d'autorenouvellement et de différenciation, les CSHs représentent le premier succès de la médecine régénératrice. Dès lors, ces cellules sont utilisées en clinique pour le traitement de certaines maladies telles que la leucémie.

Par ailleurs, le sang de cordon (SC) ombilical qui a longtemps été considéré comme un déchet biologique est maintenant reconnu comme une source très riche en CSHs. Ceci ouvre des nouveaux espoirs non seulement pour la thérapie clinique, mais aussi aux patients souffrant de certains types de cancer.

En outre, de nos jours, une multiplication de nouveaux cas de cancer, de l'infection par le virus d'immunodéficience humaine (VIH) et autres maladies, est observée. De ce fait, la demande de transplantation de CSHs prend plus d'ampleur. Ainsi, elles attirent l'attention de plusieurs études pour mieux comprendre leur différenciation, survie et prolifération. D'où l'intérêt du présent projet, qui apportera de nouvelles avenues à la compréhension de la différenciation et la prolifération des CSHs issues du SC ombilical en condition d'hyperthermie légère (39 °C).

Les résultats présentés dans ce projet ouvrent des nouvelles pistes permettant la génération des globules rouges à partir des cellules souches CD34⁺ issues du SC ombilical, qui d'un autre côté ouvriront de nouvelles sources pour répondre au besoin transfusionnel grandissant.

1.2. Hématopoïèse

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes assurant le remplacement continu et régulé des différentes cellules sanguines. Toutes les cellules du sang proviennent d'une seule population de cellule connue sous le nom de CSH.

Dans le système hématopoïétique, les cellules souches sont hétérogènes à l'égard de leur capacité à se renouveler. En effet, le progéniteur pluripotent constitue 0.05 % de cellule de la moelle osseuse et peut se diviser en trois populations différentes : CSHs à long terme d'autorenouvellement (longterm self-renewing), CSHs à court terme d'autorenouvellement (short-term self-renewing), et le progéniteur multipotent sans capacité de renouvellement détectable [1, 2]. Une fois la différenciation activée (Fig. 1.1), la CSH peut former deux populations de progéniteurs distinctes; soit une cellule progénitrice lymphoïde commune (CLP : Common Lymphoid Progenitor), et/ou une cellule progénitrice myéloïde commune (CMP : Common Myeloid Progenitor).

Les cellules progénitrices lymphoïdes communes peuvent se différencier soit en cellules B, en cellules T et/ou en cellules Natural killer (NK). Quant aux progéniteurs communs myéloïdes, elles génèrent les progéniteurs des globules rouges du sang (érythrocytes), de la plupart des différentes cellules blanches du sang (neutrophiles, éosinophiles, basophiles, monocytes, mastocytes), ainsi que des mégacaryocytes (MKs) qui sont responsables de la production de plaquettes (Fig.1.1) [3]. Les différentes cellules différenciées assurent un rôle spécifique dans l'organisme, dans cette section nos discussions porteront sur les cellules de la lignée myéloïde.

En premier lieu, les globules rouges assument le rôle de transporter l'oxygène des poumons vers tous les tissus, les cellules blanches quant à elles interviennent entre autres dans la phagocytose des microorganismes en cas d'infection (à noter que leur fonction ne se limite pas à la phagocytose), et finalement les plaquettes jouent un rôle important dans le maintien de l'hémostase [4].

Chez l'homme la grande majorité des CSHs expriment l'antigène de surface CD34. Elles n'expriment pas les antigènes de surfaces spécifiques des cellules différenciées (Lin⁻), n'expriment pas l'antigène CD38 comme chez la souris, mais expriment c-kit (récepteur du stem cell factor (SCF)) et Thy1[5]. Finalement, l'engagement du progéniteur dépend de l'acquisition d'une sensibilité à des facteurs de croissance particuliers ou cytokines (voir section 1.2.1) [4].

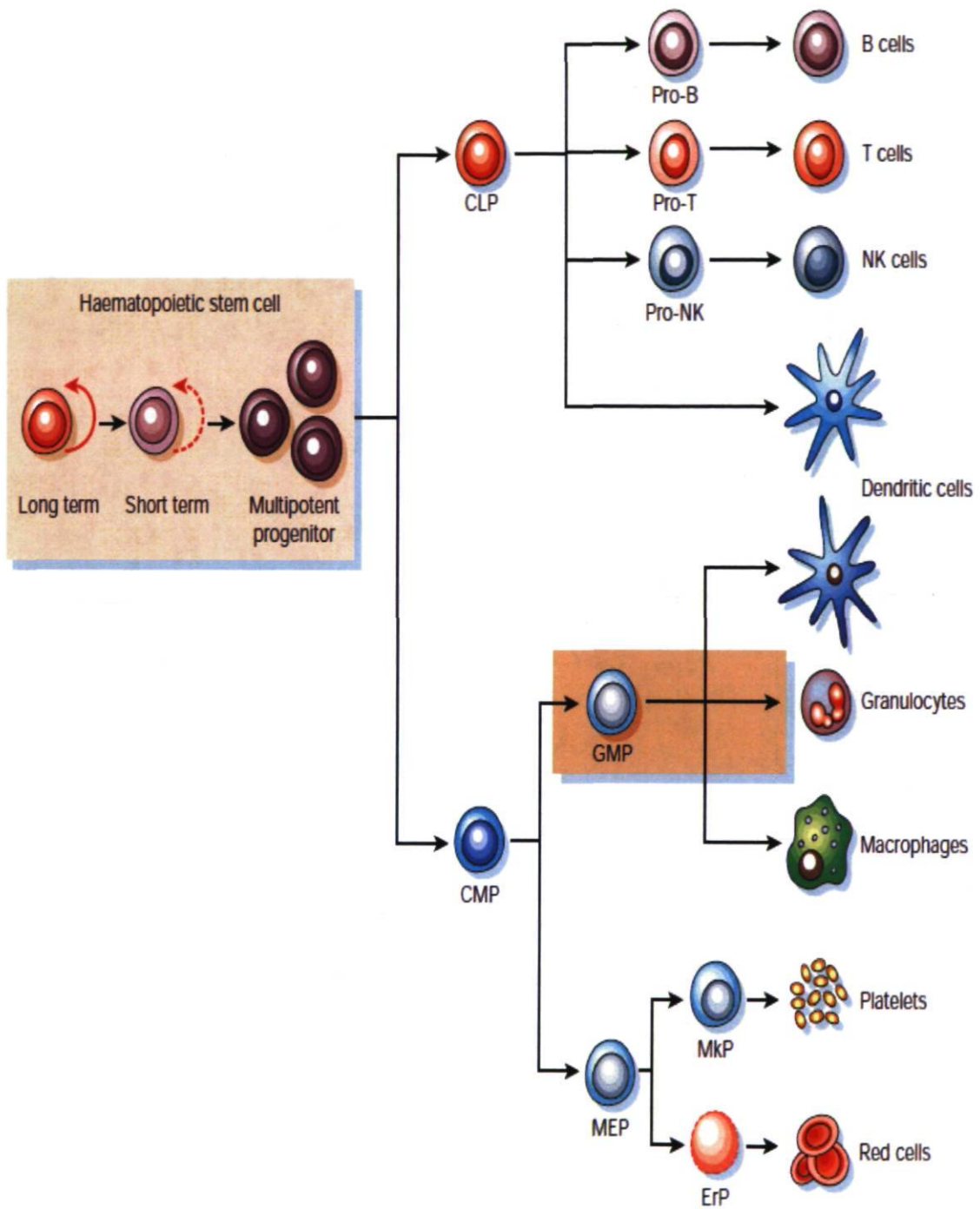


Figure 1.1: Hématopoïèse chez l'homme

De la CSH à long terme d'autorenouvellement aux cellules différenciées du sang.

Image tirée des travaux de Tannishtha et coll.[6].

1.2.1. Régulation de l'hématopoïèse

L'hématopoïèse doit être parfaitement contrôlée afin que chaque élément du sang soit produit en quantité et en temps voulu. Une perte de la régulation des CSHs à se différencier ou à s'autorenouveler peut engendrer des problèmes sérieux tels que la leucémie ou l'anémie pour ne mentionner que ces deux dysfonctionnements.

L'hématopoïèse est étroitement régulée par la combinaison de facteurs extrinsèques et intrinsèques. Ainsi, en premier lieu, on retrouve entre autres, les cytokines qui sont aussi appelées facteurs de croissance et le micro-environnement (formé des cellules fibroblastes, cellules endothéliales et de la matrice extracellulaire). Deuxièmement, on retrouve les facteurs de transcription tels que HOXB4 et GATA-1 [7]. Chacun de ces éléments assure également des rôles spéciaux et très importants dans l'organisme, pour permettre ainsi une régulation hautement contrôlée. Tout d'abord, la matrice extracellulaire joue un rôle important dans le soutien structural, l'adhérence, le mouvement et la régulation de la cellule. Cette matrice est formée entre autres, des protéines telles que le collagène, la fibronectine, la réticuline, la thrombospondine et la laminine [8]. Un certain nombre de molécules d'adhésion, incluant les intégrines et les sélectines sont exprimées à la surface des cellules hématopoïétiques. Quant aux cytokines, ce sont des molécules régulatrices, leurs liaisons à des récepteurs transmembranaires spécifiques présents sur la membrane des cellules cibles permettent de déclencher la transduction de signal. Ainsi, elles assurent un rôle important dans la régulation des différentes populations hématopoïétiques (par exemple, une augmentation de la production des cellules érythroblastes par l'érythropoïétine (EPO), se produit suite à une diminution des niveaux de globules rouges causée par l'hypoxie) en stimulant l'activation, la prolifération, et/ou la différenciation des CSHs et autres progéniteurs [9]. De ce fait, elles sont aussi nécessaires pour la survie et la maturation des CSHs en culture *ex vivo* [4].

Par ailleurs, l'entrée en cycle des CSHs se fait grâce au SCF. Ce dernier est produit par les cellules stromales dans la moelle osseuse. La liaison de SCF à son récepteur c-kit (qui fait partie de la superfamille de récepteur à activité tyrosine kinase) déclenche l'activation

de la voie de signalisation Ras/MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). Cette voie est composée typiquement de sérine/thréonine kinases. Une série de ces kinases peuvent à leur tour phosphoryler d'autres kinases, conduisant à une cascade d'événement de phosphorylation. Le tout souvent aboutit à l'activation de facteurs de transcription qui déclenchent des changements au niveau des protéines qui seront exprimées, et dont ces dernières jouent un rôle dans la croissance, la survie ou la différenciation [10]. Parmi ces facteurs de transcription les premiers à être activés après la stimulation de c-kit sont jun, fos et myc. Ces derniers permettent la transcription des gènes codant pour les cyclines et cyclines-dépendantes kinases (CDKs) permettant ainsi la prolifération cellulaire [11].

Par ailleurs, l'expression de la protéine SCF est cruciale durant la différenciation de CSHs. En effet, l'absence de cette dernière (mutation steel ou Sl) ou l'absence à la surface de la cellule le récepteur c-kit (une mutation W) peut entraîner la mort *in utero* ou pendant la période périnatale, en raison d'une anémie macrocytaire sévère (diminution du nombre de globules rouges). Ces observations suggèrent que le SCF joue un rôle essentiel au cours du développement hématopoïétique [12, 13].

En outre, les différentes cytokines hématopoïétiques régulatrices jouent leurs fonctions à trois niveaux durant l'hématopoïèse, soit au niveau des cellules souches primitives, soit au niveau des cellules intermédiaires (lignée non spécifique), et enfin au dernier niveau des cellules différenciées (lignée spécifique). Ces fonctions peuvent aller à l'engagement de la CSH vers une voie donnée [par exemple, le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) permet l'engagement des progéniteurs multipotents vers la voie myéloïde], et aussi à la différenciation d'une lignée cellulaire spécifique donnée permettant ainsi la spécialisation de la cellule [par exemple, la trombopoïétine permet l'engagement de la différenciation de MEP (Myeloid/Erythroid Progenitor) vers la voie des cellules mégacaryocytaires] [14].

D'un autre côté, les facteurs de transcription jouent aussi un rôle important dans la régulation de l'hématopoïèse, certains de ces facteurs n'affectent qu'une seule lignée en ayant un rôle spécifique, alors que d'autres affectent plusieurs lignées. Par exemple, le facteur de transcription GATA-2 est l'un qui affecte à la fois les lignées des cellules lymphoïdes, cellules érythroïdes et cellules myéloïdes [15]. Les facteurs de transcription

sont des molécules résultant du signal provenant du milieu c'est-à-dire la transduction du signal induit après la fixation de la cytokine à son récepteur (tel que décrit pour la voie Ras/MAPK) [16]. Parmi ces voies, on peut citer la voie de signalisation des tyrosines kinases JAK (Janus Kinase) et leurs cibles particulières, les facteurs de transcription STATs (Signal Transducer and Activator of Transcription) et aussi la voie PI3K (Phosphoinositide 3-kinase), PKB (Protein Kinase B) ou AKT (voir section 1.3.6) [17, 18].

1.3. L'érythropoïèse

L'érythropoïèse est l'ensemble de processus qui a lieu chez l'adulte dans la moelle osseuse permettant la formation des globules rouges. Elle prend naissance par l'engagement à partir d'une CSH (Fig.1.1) vers la voie de différenciation des cellules de la lignée myéloïde, aussi appelée CFU-GEMM (Colony Forming Unit Granulocyte/Erythroid/ Mégacaryocyte/ Monocyte). Les progéniteurs se différencient vers un progéniteur commun à la lignée de cellules érythroïdes et cellules mégacaryocytiques (MEP) [19], avant de se restreindre à la voie des cellules érythroïdes pour former le progéniteur BFU-E (Burst Forming Unit Erythroid). Le BFU-E peut proliférer et se différencier par étapes successives pour aboutir à la formation des globules rouges (Fig.1.2) [20, 21]. L'engagement des progéniteurs multipotents vers la voie des cellules érythroïdes s'effectue grâce à la combinaison de facteur de transcription (en particulier GATA-1 voir section 1.3.2) et les facteurs de croissance en particulier l'EPO (EPO section 1.3.6) ainsi que le SCF [22].

Au cours de la différenciation cellulaire, la cellule exprime différents antigènes de surface. Pour la lignée érythroïde, les progéniteurs les plus précoces expriment le récepteur du SCF : c-kit, ensuite le récepteur de l'érythropoïétine (EPO-R) commence à être exprimé au stade de BFU-E. L'antigène spécifique à la lignée érythroïde : la glycophorine A (GPA) est exprimée au stade des CFU-Es (Fig. 1.2). Pour terminer, d'autres antigènes de surface non spécifiques tels que l'antigène CD36 et le récepteur de la transferrine (CD71) sont fortement exprimés à la surface des cellules érythroïdes primitives [23].

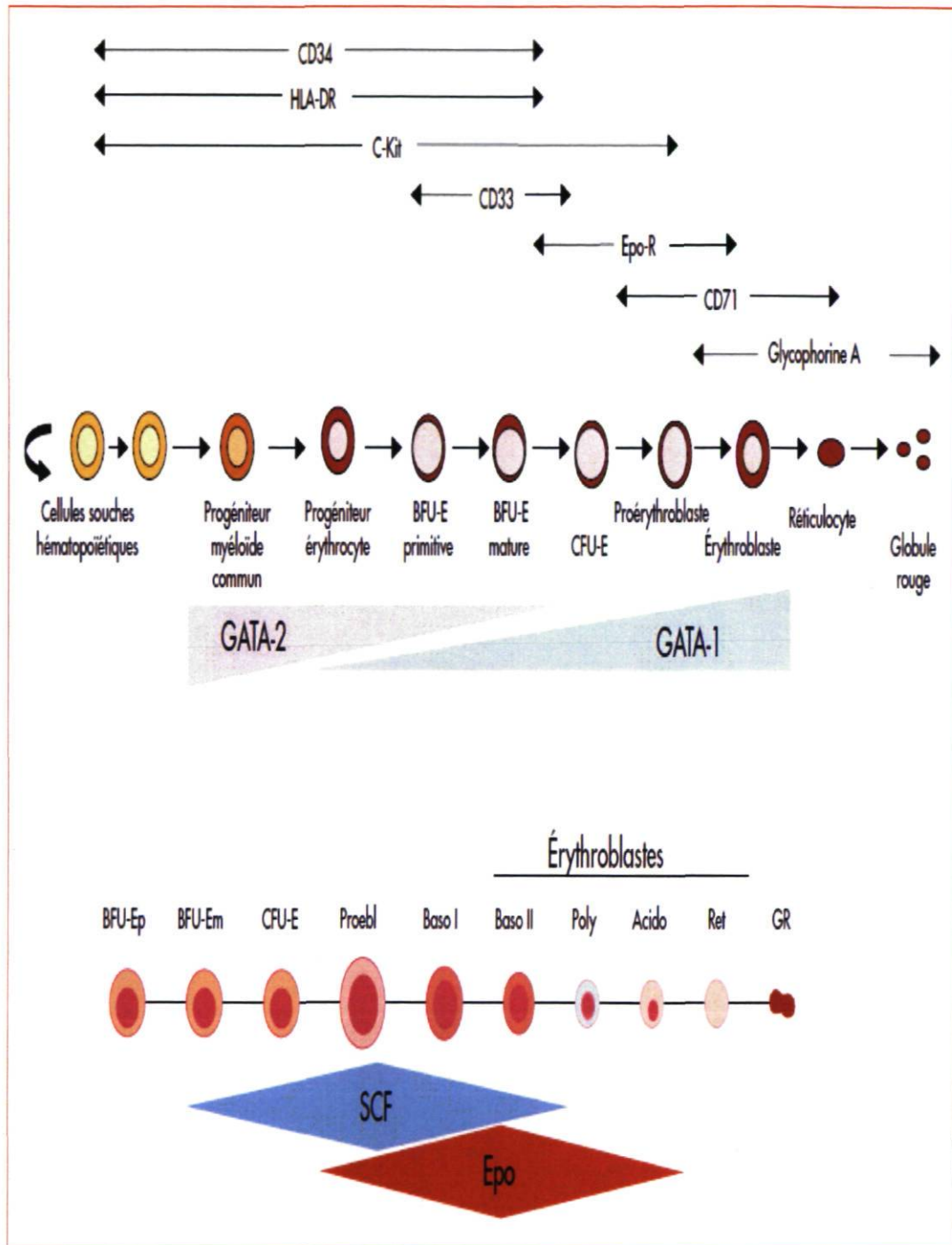


Figure 1.2: Schéma général de l'érythropoïèse

Les différents précurseurs, les facteurs de transcription ainsi que les antigènes de surface. Image tirée des travaux de Courtois et coll.[23].

1.3.1. Biochimie et fonction physiologique des globules rouges

Les globules rouges sont parmi les cellules les plus abondantes du corps humain, avec plus de 25 trillions dans la circulation sanguine, soit une concentration de 10^{12} /L de sang [24]. Les cellules érythrocytes en circulation ne contiennent pas de noyau ou d'organelles, mais elles sont remplies d'hémoglobine. Ce dernier est riche en fer et son rôle principal consiste à transporter l'oxygène des poumons aux différentes parties de l'organisme, puis à recueillir le dioxyde de carbone pour qu'il soit éliminé par la respiration [25]. L'hémoglobine est un hétérotétramère composé de deux sous-unités polypeptidiques, soit deux globines α et deux globines β , chacun se lie au groupe prosthétique de l'hème. Ce dernier est un tétrapyrrole contenant une molécule unique de fer au centre, lequel permet la liaison à l'oxygène de façon réversible [26].

1.3.2. La régulation de l'érythropoïèse par GATA-1

Tout comme l'hématopoïèse, l'érythropoïèse est hautement contrôlée et régulée à différentes étapes de la différenciation par distincts groupes de facteurs de transcription. En premier lieu, le facteur de transcription à doigt de zinc GATA-1 est considéré comme étant le facteur de transcription clé durant l'érythropoïèse. Ce dernier se lie à une séquence spécifique d'ADN, connue sous le nom de GATA box [(T/A)GATA(A/G)] permettant ainsi la régulation des gènes de différenciation des cellules érythroïdes, incluant entre autres, la GPA, les gènes de globines, l'EPO-R, ainsi que le gène codant pour la protéine anti-apoptotique Bcl-xL [27-29]. Le facteur de transcription GATA-1 est requis pour le début et la différenciation terminale des cellules érythroïdes [30]. Cette hypothèse a été évaluée par Penny et coll.[31], qui ont montré que des cellules souches embryonnaires ((ESCs) embryonic stem cell) déficientes en GATA-1 sont capables de se différencier et produire toutes les différentes cellules sanguines chez les souris chimériques, mais elles sont cependant incapables de former des globules rouges matures. Dans le cadre du même travail, des cultures *ex vivo* permettant la différenciation des cellules érythroïdes ont aussi été réalisées avec les ESCs dépourvues de GATA-1. Après des analyses morphologiques, les résultats confirmaient qu'il y avait un arrêt de la différenciation au stade de proérythroblaste (érythrocyte immature) de l'érythropoïèse (Fig.1.2) [32, 33].

Par ailleurs, Takahashi et coll.[34], ont observé avec des embryons *GATA-1 knockdown*, lesquels exprimaient environ un niveau de 5 % de *GATA-1* de type sauvage, un arrêt de la différenciation des cellules érythrocytes à l'état embryonnaire (jour de gestation E11.5 et E12.5). D'autres résultats similaires ont aussi été observés avec une autre souche de souris *GATA-1 knockdown* (~ 20 % de *GATA-1* type sauvage) [35]. L'ensemble de ces études montre le rôle fondamental de *GATA-1* dans la régulation de l'érythropoïèse. Cependant, afin d'assurer ce rôle central, *GATA-1* se lie en premier à la protéine *FOG-1* (friend of *GATA-1*), cette liaison se fait via son domaine N-terminal [36]. La protéine *FOG-1* est fortement exprimée par les cellules érythroïdes et cellules MKs, mais pas par les cellules granulocytes. Elle agit avec *GATA-1* en tant que cofacteur durant la différenciation des cellules érythroïdes et cellules MKs [37]. Un manque d'expression de cette protéine peut provoquer la mort cellulaire. En effet, des travaux ont permis de mettre en évidence que les souris dépourvues en *FOG-1* meurent d'une anémie sévère, en raison d'un arrêt de l'érythropoïèse. Ce qui évoque que la protéine *FOG-1* est vitale durant l'érythropoïèse et pour la fonction de *GATA-1*[38-40]. Par contre, la protéine *FOG-1* est incapable d'assurer à elle seule une différenciation et maturation normale des cellules érythroïdes, car elle n'a pas de domaine de liaison directe à l'ADN (Fig.1.3). Une interaction directe entre *FOG-1* et *GATA-1* est requise pour assurer sa fonction. D'ailleurs, différents travaux supportent cette hypothèse, en effet, il est connu que chez les patients souffrant de certains types d'anémie et thrombocytopénie, une absence d'interaction entre *GATA-1* et *FOG-1* est observée [41].

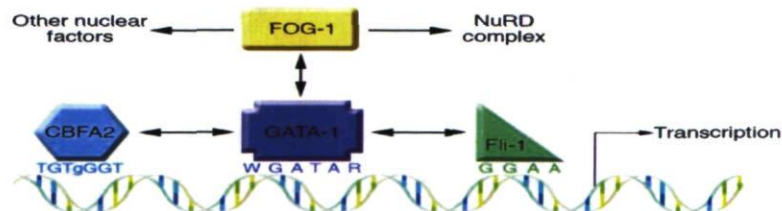


Figure 1.3: Complexe GATA-1/FOG-1

Le complexe GATA-1/FOG-1 est essentiel pour permettre la transcription des gènes.

Adaptée des travaux de Pang et coll. [41].

1.3.3. Rôle de GATA-1 dans la régulation du cycle cellulaire

La progression en phase G1 nécessite la participation des cyclines de type D (D1, D2, D3) qui répondent aux facteurs de croissance au niveau du point de restriction, moment où la cellule prend la décision d'entrer en phase S. Les cyclines dépendantes kinases (CDK qui forme un complexe avec les cyclines D) phosphorylent la protéine Rb (protéine du rétinoblastome), permettant ainsi la libération du facteur de transcription E2F, et ce dernier contrôle l'expression des protéines requises pour la phase S [42]. Lors de la différenciation terminale des cellules, le cycle cellulaire doit être arrêté. Il a été apporté que le facteur de transcription GATA-1 est impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire au cours de la différenciation terminale des cellules érythroïdes. Pour ce faire, GATA-1 jouent un rôle dans la synthèse des inhibiteurs de cyclines kinases (CKI : Cyclin Kinase Inhibitor), ces dernières jouent un rôle dans l'inhibition de la formation du complexe cycline/CDK [43]. Pour finir, le facteur de transcription GATA-1 pourrait également se lier au complexe pRB/E2F pour induire l'inactivation d'E2F, permettant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire [44, 45].

1.3.4. La régulation de l'érythropoïèse par STAT5a/b

Le deuxième facteur de transcription indispensable durant l'érythropoïèse est le Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 5. La famille des STATs comprend chez les mammifères sept membres issus de gènes différents, qui sont entre autres, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6, ils sont importants pour la différenciation des différentes cellules de la lignée myéloïde. Ils possèdent tous une structure commune organisée en six domaines N-terminal, coiled-coil et DBD (DNA Binding Domain) [46, 47]. Quand les STATs ne sont pas activés, la majorité des STATs existent sous forme monomérique non phosphorylée. L'activation des STATs par phosphorylation (par exemple l'activation d'un récepteur de cytokine) se fait généralement sur un résidu tyrosine, ceci résulte à la dimérisation et la translocation nucléaire des STATs. Après l'activation des STATs, ils se lient à des séquences spécifiques présentes sur le promoteur des gènes cibles permettant ainsi la transcription de ces derniers [48, 49]. D'après ce qui peut être observé sur la Fig.1.4, en fonction du type de cytokine dans le milieu, différents STATs peuvent être activés [50]. STAT5a/b

peut être activé suite au signal induit par EPO sur EPO-R (section 1.3.6) où il joue un rôle important dans la prolifération, la survie ainsi que la régulation de gène des cellules érythroïdes tels que la GPA, l'hémoglobine $\alpha 1/2$ et l'hémoglobine γ . Il permet aussi la régulation du gène de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL [51]. Cette hypothèse a été confirmée à partir des résultats des travaux avec des souris dépourvues STAT5a^{-/-}. Une augmentation de la mortalité a été observée chez ces dernières dues à une anémie sévère à l'état embryonnaire [52, 53]. Par ailleurs, une synergie entre STAT5a/b avec l'EPO est vitale pour permettre l'engagement du MEP vers la lignée érythroïde. En effet, une délétion de STAT5a/b provoque une diminution des progéniteurs des cellules érythroïdes, ceci conduit à une augmentation des progéniteurs MKs et par conséquent l'engagement du MEP vers la lignée mégacaryocytaire [54].

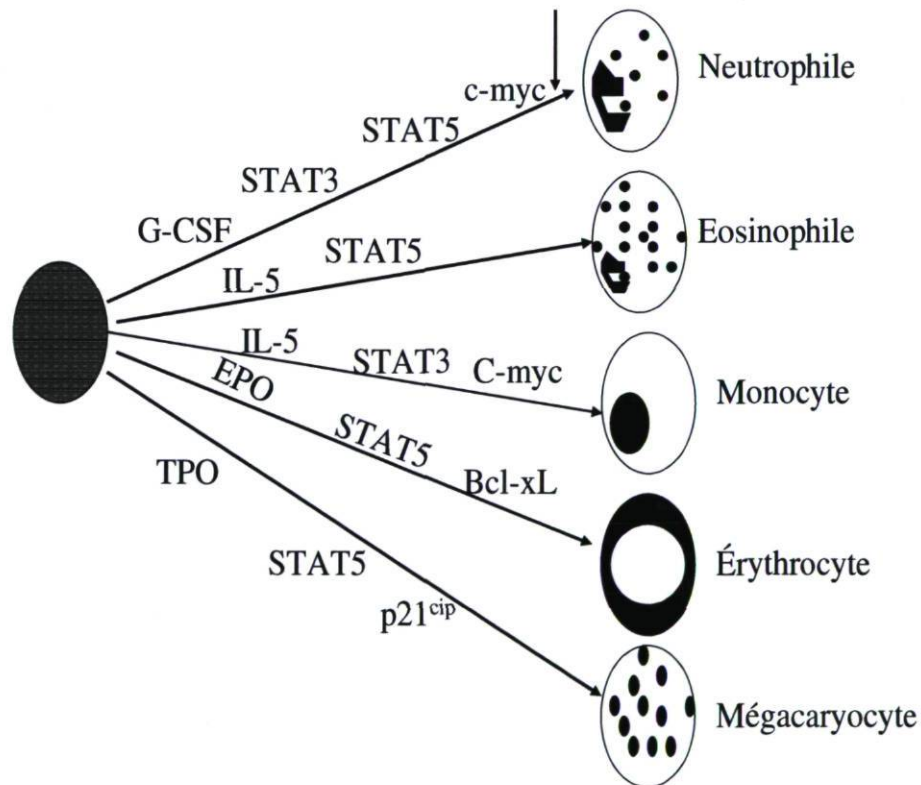


Figure 1.4 : Activation des STATs par différentes cytokines

Source tirée des travaux de Coffier et coll. [48].

1.3.5. La maturation terminale et l'énucléation des érythrocytes

Une fois que le progéniteur MEP s'engage vers la lignée des cellules érythroïdes, il y a formation des progéniteurs érythroïde (BFU-E et CFU-E), cette étape de la différenciation est identifiable morphologiquement. Les précurseurs des cellules érythroïdes nucléés progressent dans la différenciation pour former les cellules proérythroblastes et ces dernières se différencient en cellules érythroblastes basophiles, cellules polychromatophiles et cellules pycnotiques. A cette étape il y a une accumulation de l'hémoglobine, qui constitue plus de 90 % des protéines des globules rouges matures (Fig.1.5) [55]. Au cours de l'érythropoïèse définitive, les cellules érythroblastes expriment diverses molécules d'adhésion qui subissent des variations dynamiques lors de la différenciation. Ces protéines modulent les interactions entre les cellules, à la fois érythroblastes/érythroblastes et érythroblastes/macrophages ainsi que l'adhésion à des composants de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et laminine [56]. A cet égard, l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ est exprimée à la surface des cellules érythroblastes, puis la molécule d'adhésion-1 (VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1) est exprimée à la surface des macrophages, ceci permet l'interaction entre les macrophages et les cellules érythroblastes [57]. Lors de la maturation des cellules érythroblastes, une réduction progressive de la cellule et de la taille du noyau est observée, suivra ensuite une disparition des nucléoles et une condensation de la chromatine concomitante. Après il y a un arrêt du cycle cellulaire et de la réplication de l'ADN. À cette étape, une réorganisation du noyau est effectuée de façon sélective. Une expression de p53 est aussi observée dans les cellules érythroblastes pycnotiques. Il faut noter que la protéine p53 est associée à la dégradation nucléaire [23, 58]. Pour terminer, une migration du noyau à la périphérie de la cellule est également observée. Il y a redistribution des protéines de la membrane sur les réticulocytes tout en laissant le noyau dépourvu d'élément squelettique [59], ensuite suivra une perte d'affinité entre la GPA et le macrophage. Pour finir, le réticulocyte est alors libéré dans le flux sanguin, à cause d'une faible exposition de force physique. Après l'expulsion du noyau, il y a phagocytose de ce dernier par les macrophages, parce que sur la surface du noyau est exprimé des phosphatidyl sérines qui constituent un signal de phagocytose par les macrophages.

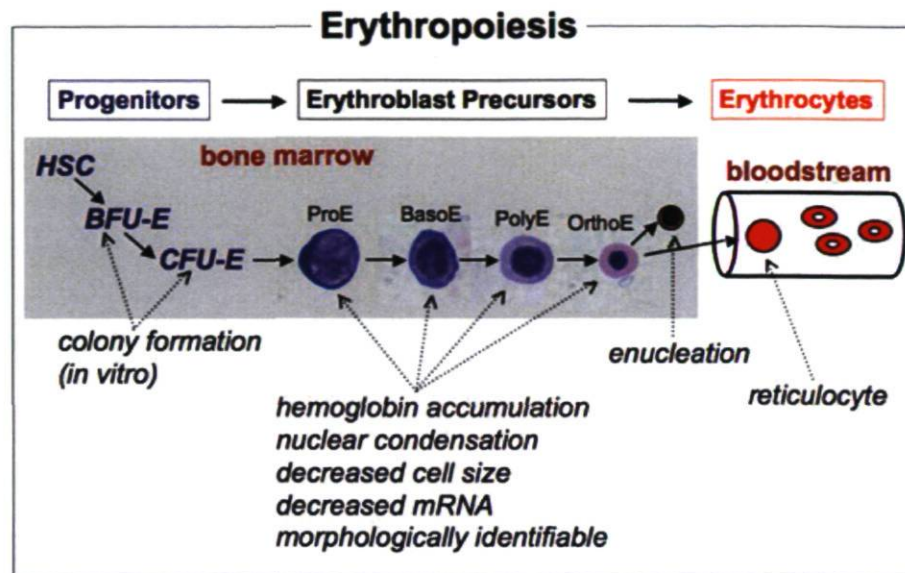


Figure 1.5: Étapes successives de la maturation des cellules érythroïde

ProE : Proérythroblaste; BasoE : Erythroblaste Basophile; PolyE : Erythroblaste Polychromophile; OrthoE : Érythroblaste Ortho ou pycnotique

Tirée de <http://radonc.urmc.rochester.edu/U19/PalisErythropoiesis.jpg>

1.3.6. Le récepteur de l'érythropoïétine

L'activation du récepteur de l'érythropoïétine (EPO-R) par EPO est vitale pour la survie, la prolifération et la différenciation des érythroblastes jusqu'à la formation des globules rouges. Cette hypothèse a été prouvée, à partir des résultats des travaux avec des souris déficientes d'EPO et EPO-R, où ces dernières mourraient d'une anémie sévère après 13 à 15 jours durant l'embryogenèse, à cause d'un manque de différenciation permettant la formation des progéniteurs de cellules érythroïdes mature [60-62].

L'EPO-R fait partie de la superfamille des récepteurs de cytokines, il est composé d'un domaine extracellulaire transmembranaire et cytoplasmique. Il apparaît sur un petit nombre des cellules érythroïdes primitives (BFU-Es), puis sa production augmente dès le stade CFU-E jusqu'aux érythrocytes matures (Fig.1.2) [63-66]. Tout comme la majorité des récepteurs de cytokine, l'EPO-R ne possède pas d'activité kinase intrinsèque. Par contre, son activation après la liaison d'EPO résulte une dimérisation du récepteur et un changement de conformation, ce qui conduit à une autophosphorylation de Janus Kinase

2 (JAK2), ainsi que la phosphorylation de différents résidus de tyrosines qui sont situées sur la portion intra-cytoplasmique d'EPO-R (Fig.1.6) [67-69]. Le rôle central de JAK2 dans la signalisation d'EPO-R a été établi, en partie avec des souris dépourvues de JAK2, lesquels développent une sévère anémie fœtale entraînant la mort à l'état embryonnaire [70, 71]. Inversement, une activation continue de JAK2 peut provoquer une prolifération non contrôlée des cellules, ceci est observé dans la maladie lymphoblastique chronique où il y a une overexpression de JAK2 [72]. La phosphorylation d'EPO-R mène au recrutement de multiples molécules de signalisation, incluant STAT5a/b, Grb2-SOS et p85. Ce qui conduit au déplacement nucléaire de STAT5a/b, qui aura comme rôle, la régulation de la transcription des gènes essentiels à la différenciation des cellules érythroïdes [73-75]. De plus, d'autres STATs sont aussi activés après stimulation d'EPO-R : STAT1 et STAT3. Cependant, contrairement à STAT5a/b, les facteurs de transcription STAT1 et STAT3 ont un rôle négatif durant l'érythropoïèse, permettant la régulation du signal induit par EPO-R [76].

Par ailleurs, l'autophosphorylation de JAK2 après stimulation d'EPO-R mène à l'activation de la voie PI3K/AKT. L'activation d'EPO-R sur la tyrosine 479 est requise pour sa fixation à p85 qui est une sous-unité de PI3K [77, 78]. La phosphorylation de PI3K permet à la phosphorylation d'AKT [79, 80]. Une fois la protéine AKT activée (via PI3K), elle phosphoryle à son tour le facteur de transcription GATA-1 (S310) [81]. Cette étape entraîne la translocation nucléaire de GATA-1, où ce dernier permet la transcription des gènes codant pour la protéine Bcl-xL et la GPA.

En outre, Kadri et coll.[82], ont confirmé que la sérine 310 de GATA-1 est le site phosphorylation d'AKT, via la stimulation d'EPO-R. En effet, ces auteurs ont utilisé différents mutants de GATA-1, soient sérine 310 par alanine (S310A) et sérine 310 par l'acide aspartique (S310D) en utilisant des cellules MEL (cellules érythroleucémiques de Friend). Ensuite, ils ont observé une régulation négative d'érythropoïèse, puisqu'il y avait un arrêt de différenciation. En 2006, Wei et coll. [81], ont inhibé la forme phosphorylée de GATA-1 (pS310), en inhibant spécifiquement PI3K par LY294002 toujours avec des cellules MEL. Par la suite, ces cellules ont été incubées à différents temps (soit 0, 10, 30 et 60 minutes). Finalement, ils ont effectué une analyse par immunobuvardage pour vérifier l'expression de la forme phosphorylée de GATA-1 (pS310). Après 60 minutes

d'incubation des cellules en présence de l'inhibiteur, le niveau d'expression de GATA-1(pS310) était presque complètement inhibé. Ces résultats suggèrent donc que la stimulation EPO-R par EPO conduit à la phosphorylation de GATA-1 sur la sérine 310 via l'activation de la voie PI3K/AKT. D'un autre côté, la stimulation d'EPO-R par EPO induit aussi l'activation de la voie Ras/MAKP permettant la phosphorylation d'ERK1/2 (Raf-Extracellulaire Regulated-Kinase 1/2) par MEK (Mitogen-Activated protein Kinase). ERK1/2 joue un rôle dans la prolifération et la survie des cellules érythroïdes via la phosphorylation des facteurs de transcription RSK et Elk [83, 84]. L'activation de cette voie est également requise durant l'érythropoïèse, puisqu'il a été prouvé que les souris *knock-out* des trois gènes de Ras (H-, N, K-ras) meurent également d'anémie à l'état embryonnaire [85].

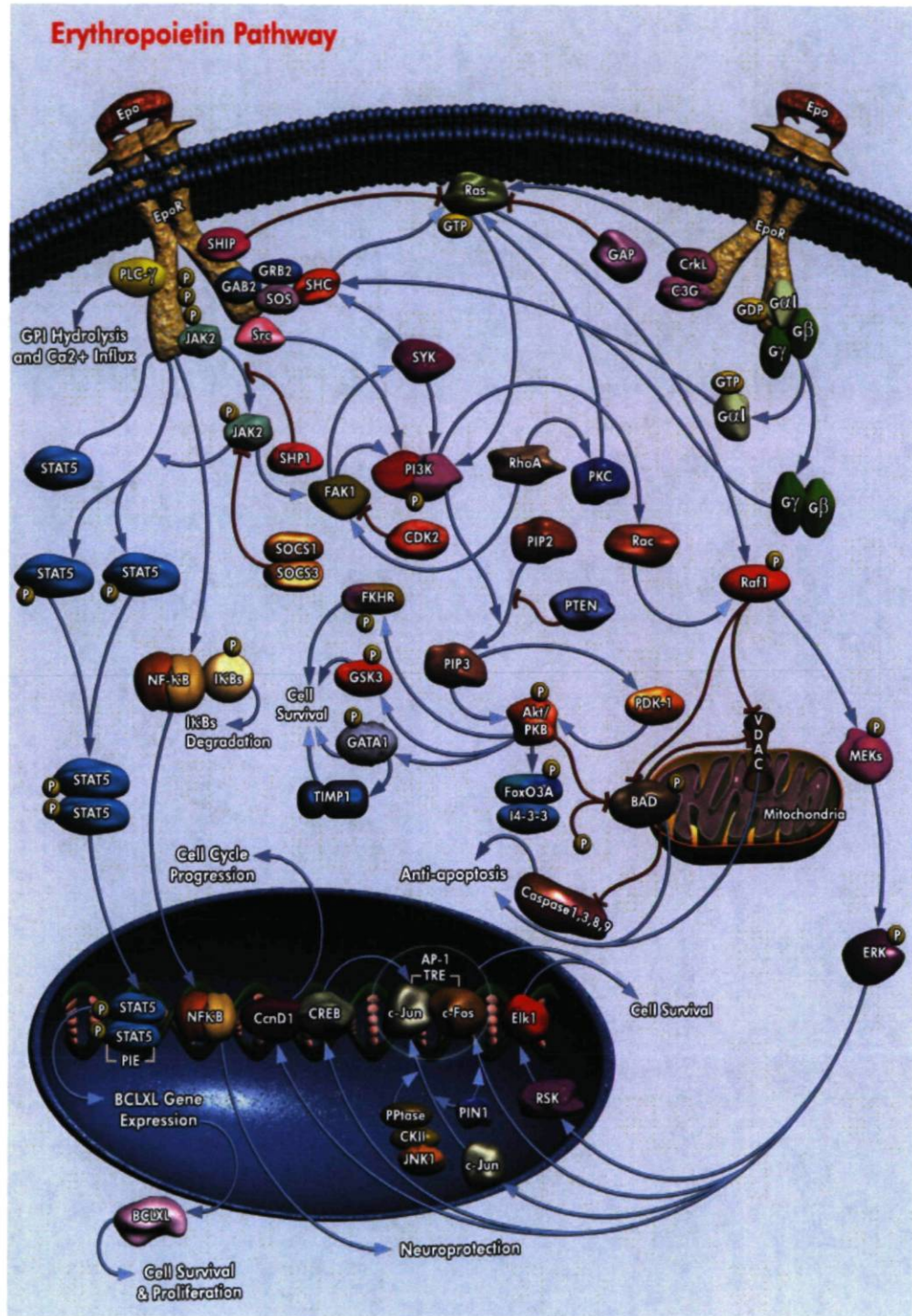


Figure 1.6: Cascade de signalisation suite à l'activation d'EPO-R par EPO.

Image tirée du site de Qiagen

<https://www1.qiagen.com/Geneglobe/PathwayView.aspx?pathwayID=165>

1.4. Culture des globules rouges *ex vivo*

1.4.1. La synergie entre l'érythropoïétine et Stem Cell Factor

La culture *ex vivo* des CSHs vers la lignée des cellules érythroïdes a été rendue possible grâce à la découverte, la purification et puis le clonage de l'EPO par Miyake et coll.[86] et Jacobs et coll.[87]. Elle est produite à partir des cellules très spécialisées au niveau du rein et du foie (Fig.1.7). Elle agit au niveau de la moelle osseuse pour stimuler la production des globules rouges [88]. Sur Fig.1.2, on peut observer que l'EPO est essentielle pour la maturation des cellules érythroblastes. Son action est indispensable surtout au stade CFU-E et son activité est considérée comme étant le premier mécanisme de régulation pour le maintien de l'hémostase [89, 90].

Par ailleurs, l'EPO est aussi utilisée en clinique pour le traitement de certains types d'anémie associés à une insuffisance rénale chronique ou pour contrer l'anémie induite par des traitements de chimiothérapie [91].

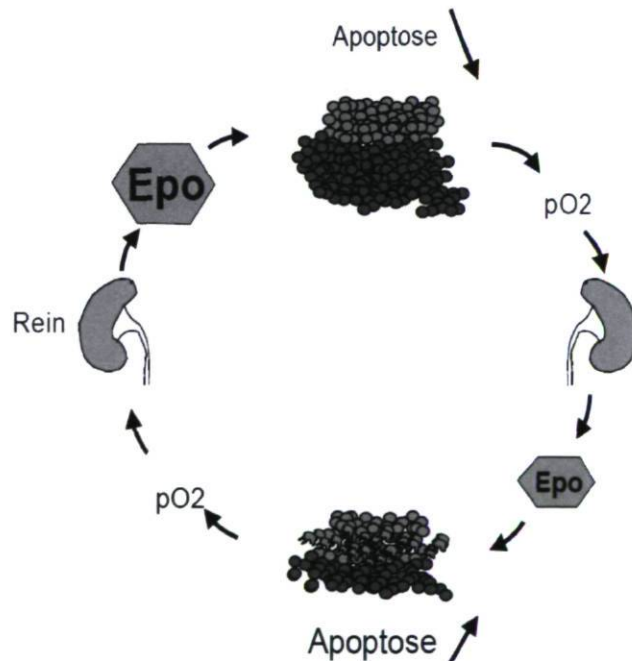


Figure 1.7: Cycle de régulation de l'érythropoïétine par le rein.

Tirée des travaux de Zermati et coll.[20].

En outre, le SCF intervient dans la régulation d'érythropoïèse. Il agit en synergie avec l'EPO et il est nécessaire en début de culture des CSHs vers la lignée des cellules érythroïdes, surtout pendant les 5 ou 6 premiers jours de culture. En effet, Dai et coll [92] ont montré que les progéniteurs BFU-Es ont besoin d'une interaction directe avec le SCF au début de la différenciation (voir la Fig.1.2). Le SCF agit au niveau des cellules érythroïdes primaires (BFU-Es) et ce, jusqu'à l'étape des érythroblastes basophiles avancés).

1.4.2. Différents travaux pour la culture des globules rouges *ex vivo*

Les besoins transfusionnels sont loin d'être résolus. Or, les critères de sélection des donneurs de sang ne cessent d'augmenter. D'où l'intérêt d'essayer de trouver un moyen permettant de produire des globules rouges *ex vivo*. Malgré le fait que plusieurs études ont été effectuées afin de mieux comprendre le développement et la régulation des globules rouges, le mécanisme d'énucléation à la fin de la différenciation des cellules érythroïdes en culture *ex vivo* reste encore partiellement inexpliqué. La difficulté de la génération des globules rouges en culture est l'atteinte de cette étape indispensable et incontournable à la fin de maturation. Pour cette raison, différents travaux ont été effectués dans le but de trouver des protocoles de culture permettant une génération des globules rouges.

Parmi ceux-ci, Giarratana et coll. [93], ont pu obtenir par ensemencement des cellules CD34⁺ issues du SC ombilical la génération d'une grande quantité de globules rouges en utilisant une culture en trois phases pendant 18 jours. Pour ce faire, ces auteurs ont mis en culture les cellules CD34⁺ en présence de SCF, IL-3 (Interleukine-3) et EPO, pour permettre la prolifération et la différenciation pendant huit jours. Par la suite, ils ont fait une coculture des cellules souches différenciées avec des cellules stromales ou mésenchymales et en utilisant comme cytokine l'EPO pendant trois jours. Pour terminer, les cellules ont été mises en culture sans facteur de croissance avec les cellules stromales seulement. Avec ce protocole, ils ont pu obtenir une production de 1.97×10^6 globules rouges par cellulesensemencées (100 % des cellules étaient des globules rouges matures à la fin de culture).

Par ailleurs, Dorn et coll. [94] ont proposé un autre protocole de culture *ex vivo* permettant la génération des globules rouges en trois phases, mais cette fois-ci à partir des cellules CD34⁺ mobilisées par le G-CSF (Granulocyte-Colony Stimilating Factor) du sang périphérique. Brièvement, pendant sept premiers jours les cellules ont été mises en culture en présence de SCF, thrombopoïétine (TPO) et Flt3-ligand. Par la suite, du jour 8 au jour 14, les cellules ont été cultivées en présence de SCF, EPO et insulín like growth factor (IGF-1). Pour terminer, les cellules ont été mises en culture en présence d'EPO et IGF-1. Avec cette méthode ils ont pu obtenir une génération de globules rouges. Ainsi, à la fin de la culture, $36.2 \pm 15.9 \%$ des cellules étaient des normoblastes, $47.9 \pm 23.9 \%$ de cellules réticulocytes et finalement, $15.8 \pm 19.4 \%$ des cellules étaient non érythroïdes. La présence de ces cellules non érythroïdes à la fin de culture sont probablement due à la première phase de culture où ils ont favorisé l'expansion massive de progéniteurs myéloïdes sans inclure l'EPO.

Pour finir, Shi-Jiang et coll. [95], ont proposé en 2008 un autre protocole intéressant permettant la génération des globules rouges en culture *ex vivo*, à partir des cellules souches embryonnaires humaines (hESCs : human Embryonic Stem Cell). Une coculture de hESC avec des cellules mononucléaires issues du SC ombilical a été effectuée en utilisant une concentration riche en SCF (100 ng/mL), IL-3 (10 ng/mL), IL-6 (100 ng/mL), de TPO (10 ng/mL), G-CSF (10 ng/mL) et 4U d'EPO. À la fin de culture, la majorité des cellules exprimaient la β -globine adulte. Par contre, il y avait aussi des cellules qui exprimaient encore la forme foetale de globine ϵ, γ . Encore une fois, cette observation était due à la source embryonnaire des cellules souches utilisées.

En résumé, les différentes études montrent qu'il est possible de générer des globules rouges en culture *ex vivo*. Cependant, certains de ces protocoles affichent une faible pureté et un rendement trop bas pour que cette application soit financièrement possible.

1.5. Lignée UT-7/EPO

Les cellules UT-7 proviennent de la moelle osseuse des patients souffrant de la leucémie mégacaryoblastique chronique. Elles expriment à leur surface les antigènes CD41 et

CD42 ainsi que la GPA. Elles expriment aussi fortement le récepteur d'érythropoïétine (EPO-R) à leur surface. Afin de permettre la différenciation de ces cellules, différentes cytokines hématopoïétiques peuvent être utilisées telles que GM-SCF, IL-3, TPO et EPO. Ainsi, ces cellules peuvent être utilisées comme modèle pour l'étude de signalisation des récepteurs de cytokines hématopoïétiques [96]. La sous-lignée UT-7/EPO a été dérivée des UT-7 après une culture de 6 mois en présence d'EPO seulement. Ce clone est dépendant de l'EPO pour sa croissance et survie en culture [97].

1.6. La granulopoïèse et monocytopoïèse

Tout comme l'érythropoïèse, la granulopoïèse est une succession de processus qui a lieu dans la moelle osseuse permettant la formation des cellules granulocytaires. Elle prend naissance par l'engagement à partir d'une CSH (Fig.1.1) vers la voie de différenciation myéloïde, CFU-GEMM. Ces progéniteurs se différencient par la suite en GMP et MEP, puis sous l'effet du G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor), le GMP se différencie vers la voie restreinte de granulocyte, pour former CFU-G (Colony Forming Unit-Granulocyte), qui se différencie en myéloblaste jusqu'à la formation des granulocytes matures (Fig.1.8). Les cellules granulocytes sont classés en cellules neutrophiles, éosinophiles ou basophiles [5]. Il est à noter qu'en cas d'infections virales, une augmentation des cellules neutrophiles est observée, où ces derniers jouent un rôle important dans la phagocytose [4].

Comme toutes les lignées hématopoïétiques, la granulopoïèse est aussi régulée par une combinaison de cytokines et de facteurs de transcription. La cytokine essentielle durant la différenciation des granulocytes est le G-CSF, elle est exprimée par des cellules neutrophiles, les cellules endothéliales, les fibroblastes ainsi que les cellules stromales dans la moelle osseuse. Tout comme l'EPO, le G-CSF se fixe sur son récepteur : le G-CSF-R (G-CSF Receptor) pour permettre l'activation de la transduction du signal. Ce récepteur fait partie de la superfamille des récepteurs de cytokines semblable à EPO-R. Il est dépourvu d'activité de tyrosine kinase intrinsèque, par contre, il contient sur son domaine cytoplasmique la protéine JAK2 qui s'autophosphoryle après stimulation de G-CSF-R par le G-CSF [98].

En outre, les facteurs de transcription C/EBP α (CCAAT/Enhance Binding Protein α) et c-Myb sont requis pour la différenciation terminale des cellules granulocytes, ils permettent entre autres, la transcription des gènes codant les antigènes de surface CD33 et CD11. Ces facteurs de transcription résultent de la stimulation G-CSF-R par G-CSF [99]. Une absence de C/EBP α provoque aussi une absence des cellules neutrophiles mature [100]. En effet, cette hypothèse est appuyée par l'analyse du foie fœtal des cellules de souris déficientes de C/EBP α , où une absence de G-CSF-R est aussi observée [101].

Par ailleurs, sous l'action de M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor), les CFU-GMs évoluent en promonocyte (monocyte très immature), puis ce dernier prolifère et se différencie à son tour jusqu'à la formation des cellules monocytes matures. La monocytopoïèse est également régulée par une combinaison des cytokines et par les facteurs de transcription. Le M-CSF est la cytokine de référence durant la différenciation des cellules monocytaires. Sa liaison à son récepteur M-CSF-R permet l'activation de la transduction du signal semblable à celle induite par G-CSF-R [102]. Dans les cellules monocytes immatures, le promoteur de M-CSF-R est activé synergiquement par C/EBP α , et PU.1 [103, 104] et c-jun active directement le M-CSF-R via son interaction avec PU.1 [105, 106]. Le promoteur de l'antigène de surface CD14 est activé par C/EBP α [107], ainsi, les cellules monocytes matures expriment fortement à leur surface l'antigène CD14. Le facteur de transcription de C/EBP α joue un rôle déterminant dans la spécificité du progéniteur bipotent granulocyte-monocyte (GMP). En effet, le progéniteur commun myéloïde (CMP) peut se différencier soit en MEP ou soit en GMP. Afin de permettre la différenciation de CMP vers la lignée GMP, le facteur C/EBP α provoque une réduction de la régulation de l'ARN de FOG-1 (requis pour l'activité transcriptionnelle de GATA-1)[108], ceci permet de réduire le niveau d'activité de GATA-1 [109-112]. Finalement, un niveau élevé de PU.1 permet de diriger la différenciation vers la lignée monocyttaire [113, 114]. Tout comme les granulocytes, le rôle principal des monocytes est la phagocytose lors de l'infection ou le processus d'apoptose.

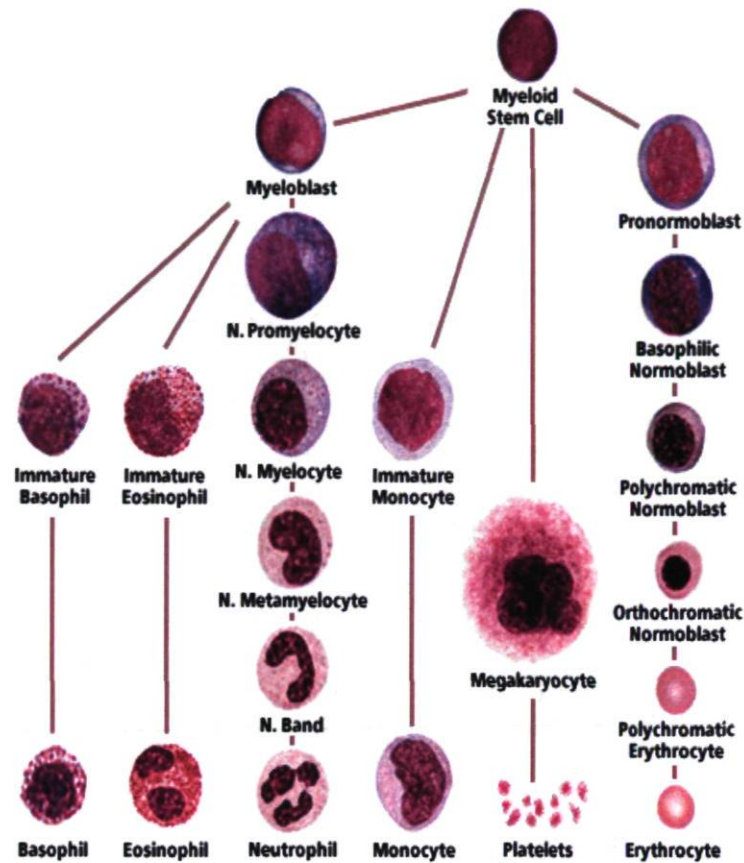


Figure 1.8: Vue d'ensemble de la granulopoïèse et monocytopoïèse

Tirée du site de l'University of Minnesota. Department of laboratory medicine and pathology. www.umn.edu/hema

1.7. Effet de l'hyperthermie légère sur la mégacaryopoïèse

L'effet bénéfique de l'hyperthermie légère sur la prolifération et la différenciation des cellules $CD34^+$ vers la lignée des cellules MKs, a déjà été étudié par notre groupe de recherche à Héma-Québec. En effet, des cultures des cellules $CD34^+$ issues du SC ombilical ont été effectuées à 37°C et 39°C . Il a été montré que la prolifération des cellules MKs était augmentée pour les cultures maintenues à 39°C [115]. Ceci était accompagné par une accélération de la différenciation et de la maturation des MKs, c'est-à-dire une apparition rapide du marqueur de surface CD42b qui est exprimé par les Cellules MKs matures. La production des plaquettes était aussi significativement augmentée.

Afin de mieux caractériser la température optimale qui permettait d'avoir un effet remarquable sur la différenciation des cellules, un intervalle de température entre 38°C et 41 °C a été évalué. Finalement, 39 °C s'est avéré la température optimale permettant l'accélération de la différenciation et l'augmentation de l'expansion des Cellules MKs. Il faut noter qu'une des conséquences majeures de la culture des cellules hématopoïétique en condition d'hyperthermie est qu'elle réduit souvent la viabilité et l'expansion cellulaire en fonction de la température

Par ailleurs, les travaux de Pineault et coll. [116] étaient aussi basés sur l'étude des effets de l'hyperthermie légère sur la viabilité des cellules CD34⁺ issues du SC en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée Cellules MKs. Ils ont pu mettre en évidence que la viabilité cellulaire à 39°C était seulement réduite pendant les cinq premiers jours de culture, suggérant que les cellules du SC et plus précisément les cellules MKs y provenant pouvaient supporter de telle condition thermique. Une autre constatation significative est que les effets associés à l'hyperthermie légère semblaient être indépendants des cocktails de cytokines utilisés, mais possiblement dépendants de TPO. Pour évaluer ce phénomène, Pineault et coll. [116] ont utilisé le cocktail de cytokine BS1 qui a été optimisé pour la culture des cellules Mks (BS1, TPO 30 ng/ml, SCF 1 ng/ml, IL-6 7,5 ng/ml et IL-9 13,5 ng/ml). Avec ce cocktail, ils ont été capables de reproduire le même résultat de l'effet de l'hyperthermie légère sur la différenciation des cellules MKs entre 4-7 jours au lieu de 14 tel que cela a été démontré par Proulx et coll. [115]. En fait, ils ont trouvé que 4 jours d'incubation des cellules CD34⁺ à 39 °C étaient suffisants pour observer une différence significative d'apparition de l'antigène de surface CD42b pour les cultures maintenues à 39 °C par rapport à celles à 37 °C.

Finalement, il est bien connu que les cellules de mammifères en condition d'hyperthermie ont un niveau élevé des protéines de choc thermique (HSP : Heat Shock Protein). L'expression des protéines a été évaluée à différents moments de culture dans la première étude de Proulx et coll. [115], aux jours 7 et 10 respectivement. Les cellules CD41a⁺ maintenues à 39 °C exprimaient 2 fois plus de HSP70 comparativement à celles maintenues à 37 °C.

1.8. Rôle des protéines de choc thermique dans l'érythropoïèse

Selon ce qui a été discuté dans la section 1.3 et 1.3.6, l'érythropoïèse est régulée par une combinaison des cytokines et les facteurs de transcription. Cependant, les cellules érythroïdes de mammifère subissent aussi une régulation post-transcriptionnelle, spécialement à la fin de la maturation des érythrocytes, durant laquelle une absence du noyau est observée. Il y a environ 20 ans, différents groupes de recherches ont apporté l'hypothèse qu'une accumulation de la chaperonne HSP70 était observée dans les précurseurs des cellules érythroïdes [117-119]. En conséquence, ces auteurs spéculaient que HSP70 et autres chaperonnes apparentées (dont le rôle connu était la régulation du repliement tridimensionnel, la dégradation ainsi que l'activité d'autres protéines), pouvaient avoir un rôle dans la maturation des cellules érythroïdes [120].

Par ailleurs, le facteur de transcription GATA-1 peut être la cible de la caspase-3, qui induit son clivage. Cette étape est requise pour permettre une régulation négative d'érythropoïèse [121]. Par contre, si la caspase-3 est activée tôt dans l'érythropoïèse, ceci provoque le clivage de GATA-1, ensuite suivra un arrêt de l'expression des gènes nécessaires à la maturation et conduit ainsi à un blocage de la différenciation des cellules érythroïdes au stade des proérythroblastes (Fig.1.9A). De plus, le clivage de GATA-1 va conduire à une diminution de l'activité du promoteur du gène de Bcl-xL, ce qui provoquera l'apoptose des cellules [122].

Récemment, Ribeil et coll. 2007 [123], vient de mettre en évidence, le rôle de HSP70 dans la régulation d'érythropoïèse. Pour éviter le clivage de GATA-1 par la caspase-3, la protéine HSP70, qui est exprimée de façon constitutive dans les cellules érythroïdes, sous l'influence de l'EPO, se déplace du cytoplasme vers le noyau pour se lier à GATA-1 protégeant ce dernier contre le clivage par la caspase-3. Cette interaction permet la différenciation des cellules érythroïdes (Fig.1.9B).

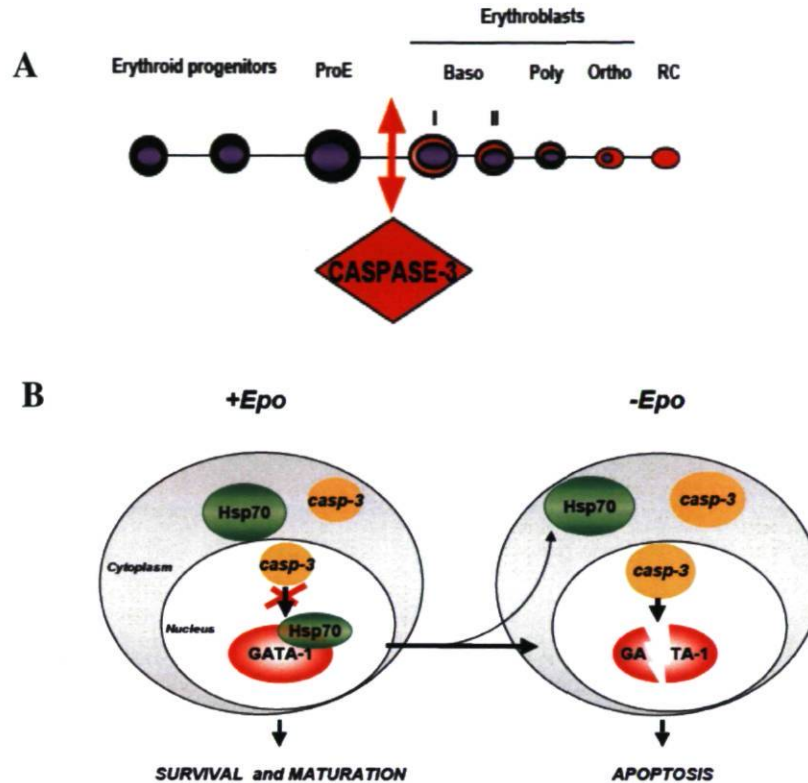


Figure 1.9: Co-localisation nucléaire de GATA-1 et Hsp70

A : L'activation de la caspase-3 et un arrêt de la différenciation. **B** : Co-localisation de Hsp70 et GATA-1. Image tirée des travaux de Ribeil et coll. [123].

En outre, d'autres chaperonnes telles que HSP27 et HSP90 peuvent être activées par AKT, via l'activation de PI3K, après l'activation de certains récepteurs de cytokines. Dans les cellules au repos, HSP27 forme un complexe avec la protéine AKT [124]. Mais l'activation de cette dernière par PI3K provoque la dissociation du complexe, libérant ainsi HSP27, qui aurait aussi un rôle dans l'inactivation des caspases, de ce fait, elle protège les cellules contre l'apoptose permettant la différenciation cellulaire [125]. En ce qui concerne HSP90, c'est la chaperonne la plus abondante dans les cellules, elle est produite de façon constitutive et peut représenter jusqu'à 1-2 % de toutes les protéines cytosoliques. Elle joue aussi un rôle dans la régulation de l'apoptose en activant la protéine anti-apoptotique Bcl2 ainsi que l'inactivation de la caspase-9 [126, 127].

Par contre, contrairement à HSP70, il n'existe pas encore de relation directe entre HSP27, HSP60 et HSP90 dans la régulation de l'érythropoïèse. Néanmoins, différentes pistes pourraient emmener à trouver un lien entre HSP27 et la régulation d'érythropoïèse. En effet, selon ce qui peut être observé sur la Fig.1.10, la cible de HSP27 est l'inactivation de la caspase-3. Or, c'est l'activation de cette voie qui provoque le clivage de facteur de transcription clé des cellules érythroïdes : GATA-1. Ainsi, HSP27 pourrait avoir un rôle dans la régulation d'érythropoïèse en protégeant GATA-1 contre le clivage, comme tel est le cas de HSP70. Selon la même Fig.1.10, HSP60, a aussi comme cible la caspase-3, son rôle pourrait être semblable à HSP27 dans la régulation d'érythropoïèse.

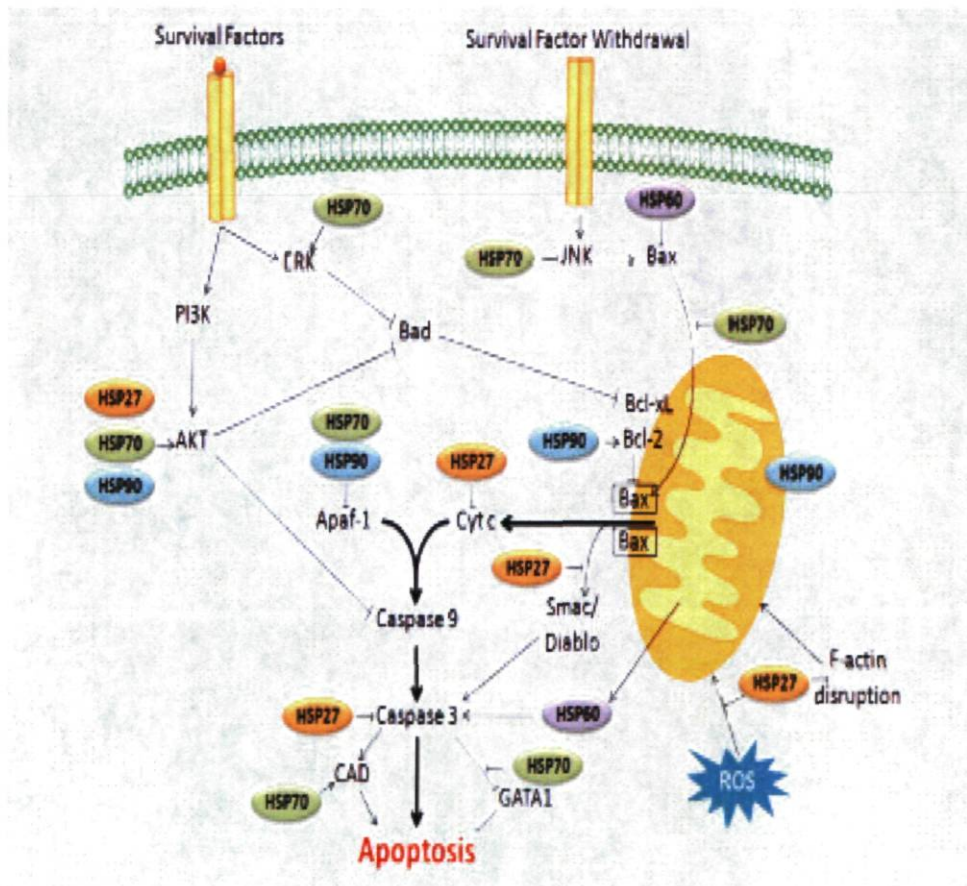


Figure 1.10: Régulation de l'apoptose par les HSPs.

Image tirée des travaux de Lanneau et coll.[128].

1.9. Mécanisme de la maturation des cellules érythroïdes à 39°C

Nous avons développé un modèle dans le but de vérifier la voie par laquelle l'hyperthermie légère pourrait permettre l'accélération de la différenciation des cellules érythroïdes. À cet égard, deux voies semblent être possibles, soit la transduction de signal induit par EPO-R, soit par les HSPs. En conséquence, l'hyperthermie pourrait permettre une dimérisation d'EPO-R et induire ainsi l'activation de la cascade de signalisation, ou l'hyperthermie permettrait une augmentation du niveau d'expression de HSP70 qui permettrait une protection de GATA-1 et dont ce dernier jouerait un rôle important dans la transcription des gènes essentiels à la différenciation des cellules érythroïdes entre autres, la GPA, l'hémoglobine, etc. (Fig.1.11)

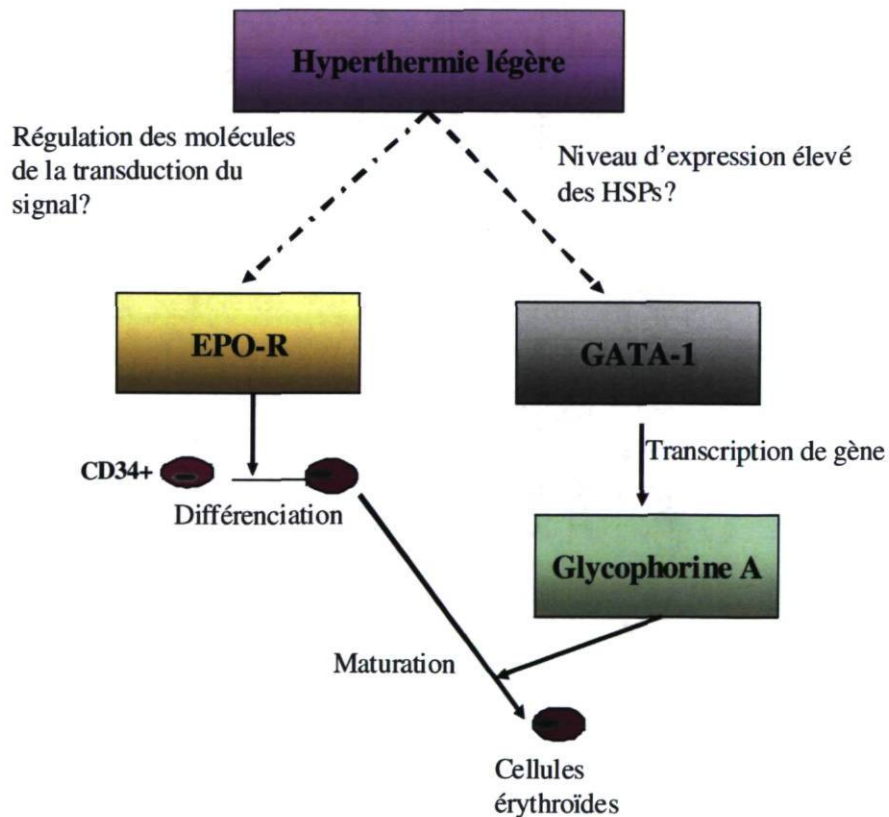


Figure 1.11 : Les voies potentiellement activées par l'hyperthermie légère

1.10. Effet biologique et moléculaire de l'hyperthermie légère

L'hyperthermie légère joue un rôle dans l'activation de la voie de signalisation Ras/MAPK (Fig.1.12). L'activation de cette voie par l'hyperthermie légère permet l'activation de la voie PI3K/AKT qui joue un rôle dans la synthèse de la cycline D1. La protéine AKT activée via PI3K joue un rôle dans la régulation de la survie cellulaire, en activant des molécules de pro-survie et en inactivant des molécules pro-apoptotique (pGSK-3 β , forme inactive). L'activation de la voie Ras/MAPK conduit aussi à l'activation d'ERK1/2. La phosphorylation d'ERK1/2 sur T202/T204 est impliquée dans la survie cellulaire dans les cellules en condition de stress [129]. Par ailleurs, il est connu que l'hyperthermie légère est aussi impliquée dans l'activation de plusieurs récepteurs de cytokines tels que le récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor) en affectant la structure et la motilité de la membrane. Ensuite, l'activation de ce récepteur mène à l'activation de la voie Ras [129].

Finalement, Sharif-Khatibi et coll. [130], ont affirmé en 2007 que l'hyperthermie légère favorise la différenciation des cellules leucémiques. Or, normalement la différenciation de ces cellules est arrêtée et il n'y a pas de maturation. Ce résultat suggère que l'hyperthermie légère a un effet positif sur les cellules utilisées. Afin d'examiner cet effet, ces auteurs ont mesuré la synthèse de l'hémoglobine et de l'expression la GPA à 43°C, puis à différents temps (30, 60 et 90 minutes). Il s'est avéré que 90 minutes d'incubation des cellules à 43 °C étaient suffisantes pour permettre la synthèse de l'hémoglobine. Ils ont aussi vérifié le niveau d'expression de HSP70, et ils ont observé une augmentation de cette dernière dans les cellules, ceci suggérait que la protéine HSP70 protégeait les cellules contre l'apoptose permettant ainsi la différenciation des cellules.

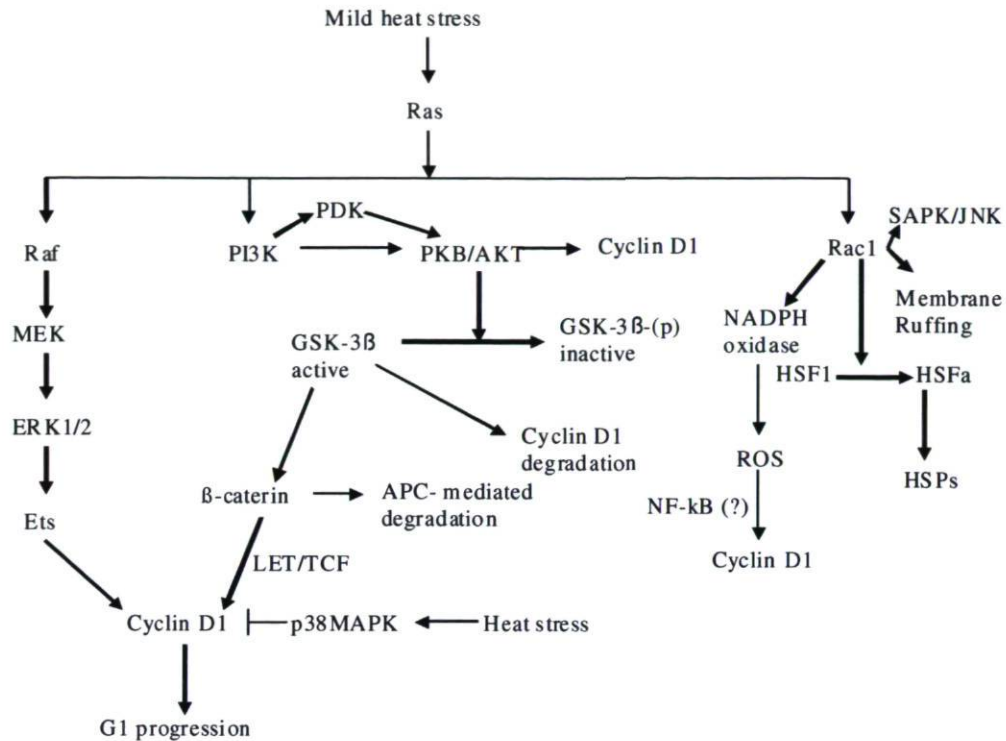


Figure 1.12: Effet de l'hyperthermie légère sur l'activation de Ras/MAPK.

Source tirée des travaux de Park et coll. [131].

1.11. Modulation des voies JAK/STAT, PI3K/AKT et ERK1/2 à 39 °C

La combinaison des informations ci-dessus nous a permis de développer un modèle permettant d'analyser l'effet de l'hyperthermie légère sur l'activation de ces différentes voies de signalisation. Ceci dans le but de vérifier si l'activation de ces voies était nécessaire et suffisante pour l'effet de l'hyperthermie légère sur la différenciation des cellules érythroïdes. Ainsi, sur la Fig.1.13, on remarque que l'inhibition de ces voies devrait conduire au blocage de plusieurs protéines impliquées dans la régulation de l'érythropoïèse et qui entre autres, activent aussi la transcription du gène GPA. De ce fait, une analyse de l'apparition du phénotype de différenciation des cellules érythroïdes (antigène de surface GPA) par cytométrie permettait de vérifier si on gardait l'effet de l'hyperthermie légère sur la différenciation suite à l'inhibition.

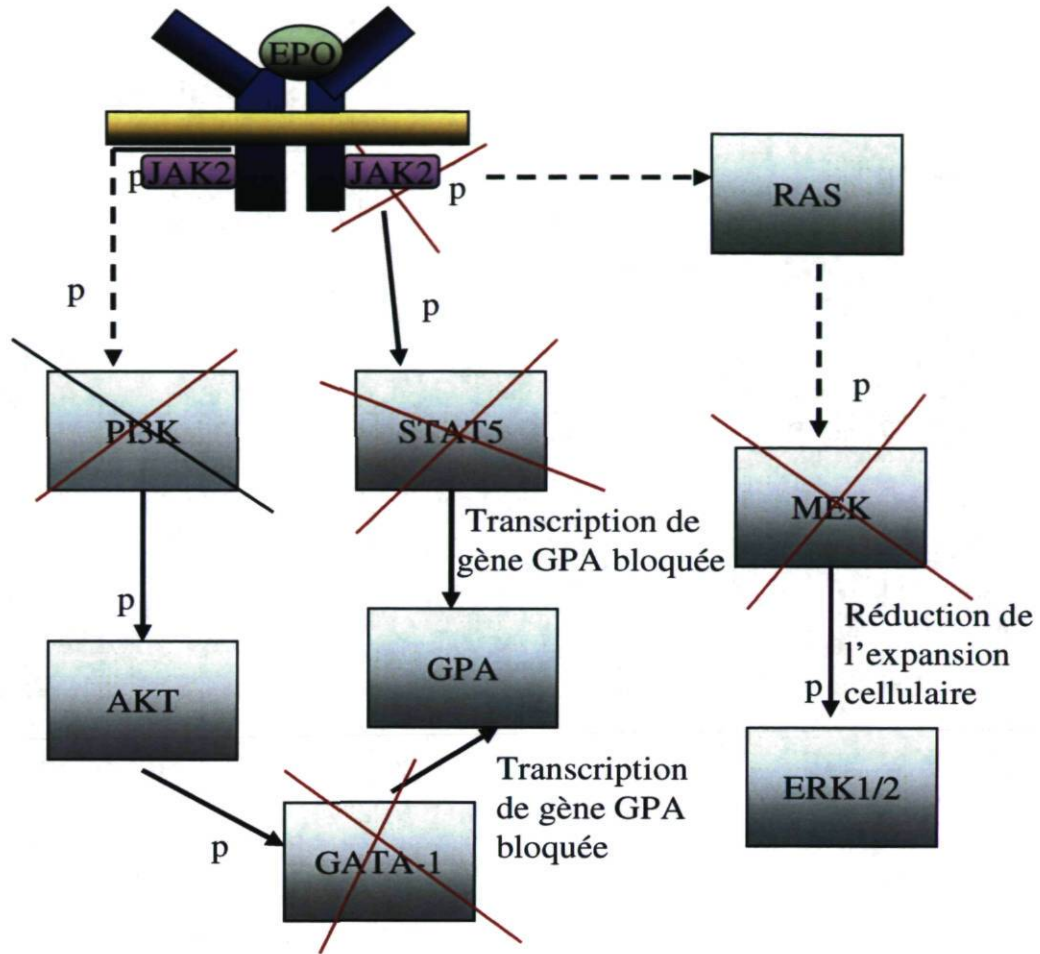


Figure 1.13: Modèle de régulation des voies JAK/STAT, PI3K/AKT et MEK/ERK1/2 par l'hyperthermie légère

1.12 Problématique du projet de recherche

Telle que décrite dans la section 1.7, l'hyperthermie légère favorise une accélération de la différenciation et une augmentation de la prolifération des cellules CD34⁺ issues du SC ombilical vers la lignée des cellules mégacaryocytaires [115]. Par contre, il reste d'une part à déterminer si de tels effets pourraient être observés sur la lignée des cellules érythroïdes qui est issue du même progéniteur commun des cellules MKs (MEP). Puis de d'autre part, il faut déterminer l'effet de l'hyperthermie légère sur l'expansion et la différenciation des granulocytes et monocytes issues d'un autre progéniteur commun, le GMP. Afin de mieux caractériser l'effet de l'hyperthermie légère sur ces lignées, il fallait tenir compte de la hiérarchie lors de la différenciation de CSHs, ainsi que les similarités entre les facteurs de transcription intervenant dans la régulation des différentes lignées des cellules myéloïdes.

En premier lieu, les MEPs expriment à leur surface l'EPO-R et le récepteur de la thrombopoïétine (Mpl). En fonction de la concentration des cytokines EPO ou TPO dans le milieu, la différenciation des MEPs est dirigée soit vers la lignée des cellules érythroïdes, soit vers la lignée des cellules MKs [41]. De plus, la protéine TPO est très homologue à celui d'EPO surtout sur le domaine N-terminal, ce qui suggère que les différentes voies de signalisation activées par leurs récepteurs correspondants sont aussi très similaires [132, 133]. En outre, les cellules de la lignée des cellules érythroïdes et Cellules MKs ont aussi en commun les mêmes facteurs de transcription (GATA-1 et son co-facteur FOG-1, NF-E2, Fli-1 etc). De ce fait, une similarité entre les facteurs de transcription pourrait aussi suggérer qu'il serait possible d'observer les mêmes effets de l'hyperthermie légère sur l'érythropoïèse à ceux observés sur la mégacaryopoïèse.

D'un autre côté, les cellules de la lignée granulocytes et monocytes ont aussi un progéniteur commun, et partagent aussi certains facteurs de transcription soit C/EBP α et PU.1. Ceci pourrait sous-entendre que l'effet de l'hyperthermie légère sur ces deux lignées pourrait aussi être similaire. Mais, par contre, il est impossible de prédire si les effets seront similaires à ceux observés chez les cellules MKs, ceci étant basé sur les

différences importantes entre ces lignées. Ce qui nous a permis d'émettre une hypothèse générale.

1.12.1. Hypothèse générale et objectifs des travaux

Notre hypothèse principale de travail est que l'hyperthermie légère permet d'accentuer l'expansion et d'accélérer la différenciation des cellules myéloïdes, en stimulant l'entrée en cycle cellulaire des progéniteurs multipotents CD34⁺.

L'objectif principal de ce projet de maîtrise était premièrement de prouver l'hypothèse énoncée ci-dessus et, deuxièmement, de mieux caractériser les effets de l'hyperthermie légère sur la prolifération, la différenciation ainsi que la maturation de ces différentes lignées. Finalement, d'essayer d'identifier le ou les mécanisme(s) responsable(s) dans le cadre de la voie de différenciation des cellules érythroïdes.

Objectif 1 : Définir les effets de l'hyperthermie légère sur l'expansion et la cinétique de différenciation des cellules CD34⁺ le long de la voie des cellules érythroïdes, granulocytes et monocytes.

- ❖ Pour accomplir cet objectif, les cellules CD34⁺ ont été mises en culture dans des milieux de culture définis spécifiquement pour chacune de ces lignées.
- ❖ Les effets de l'hyperthermie légère sur l'expansion et la différenciation ont été déterminés par des cinétiques d'expansion cellulaire (compte et cytométrie en flux) et étude de morphologie.

Objectif 2 : Déterminer l'impact de l'hyperthermie légère sur le cycle cellulaire des cellules CD34⁺ (transition G0 à G1, et G1 à S/G2/S).

- ❖ Pour ce faire, les cellules CD34⁺ ont étéensemencées et mises en culture en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée érythrocytaire et incubées à 37 °C et 39 °C. L'effet de l'hyperthermie légère sur l'entrée en cycle

cellulaire a été mesuré par cytométrie en mesurant l'expression de l'antigène de surface Ki-67.

Objectif 3 : Caractérisation des mécanismes de l'effet de l'hyperthermie légère sur les cellules de la lignée des cellules érythroïdes

- ❖ Cette étape a été effectuée en ciblant les facteurs clés impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse. Cette partie des travaux a été évaluée par immunobuvardage, cytométrie intracellulaire et essai de luciférase.

Objectif 4 : Définir l'impact de l'hyperthermie légère sur les progéniteurs multipotents (CMP, MEP et GMP).

- ❖ Pour ce faire, les cellules CD34⁺ ont été placées en culture à 37 °C et 39 °C dans un milieu permettant l'expansion des progéniteurs à l'aide d'essai des progéniteurs myéloïdes sur milieu semi-solide (méthylcellulose). Ensuite, l'effet de l'hyperthermie légère a été déterminé par le décompte de l'expansion des progéniteurs

2. Matériel et méthodes

2.1. Cellules souches hématopoïétiques (CSHs)

2.1.1. Échantillons de sang de cordon ombilical

Tous les échantillons du sang de cordon (SC) utilisés dans ce projet provenaient de l'hôpital Saint François d'Assise (HSFA), avec l'accord du comité d'éthique de la recherche d'Héma-Québec ainsi que celui de HSFA. Immédiatement après l'accouchement, le SC était récupéré dans une poche de don de sang (Single blood-pack unit 250 mL with donor tube, Corporation Baxter, Mississauga, Ontario, Canada) environ 75-100 mL. Chaque échantillon de sang était accompagné d'un formulaire de consentement signé par la mère du nouveau-né en santé.

2.1.2. Isolement des cellules mononuclées à partir du sang de cordon

L'isolement des cellules mononuclées (MNCs : Mononuclear Cells) du SC ombilical était effectué par centrifugation. Brièvement après réception de l'échantillon, le sang était séparé dans des tubes de 50 mL (Becton Dickinson Labware), environ 30 mL par tube. Puis, les tubes étaient centrifugés à 514 g, 10 minutes sans frein. Ensuite, le plasma était enlevé et remplacé par du tampon phosphate contenant de la saline et contenant 2 g/L de glucose (PBS-Glucose) (Invitrogen, Burlington, Canada). Le sang était déposé sur un coussin de Ficoll Paque Plus™ (1,077 g/ml, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) dans des tubes Leucosep (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany) et centrifugé à 1860 RPM, 15 minutes sans frein (Beckman GS-6; Spinco Division Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). Les MNCs étaient récoltées à l'interface Ficoll/Plasma, lavées 2 fois dans du PBS-glucose à 2090 RPM, 6 minutes et 185 g, 10 minutes sans frein. Le culot était remis en suspension dans 50 mL de PBS-Glucose puis un aliquot était prélevé pour effectuer un compte cellulaire en présence d'acide acétique 3 % qui permettait de faire éclater les globules rouges pouvant s'être infiltrés dans la suspension. Une dernière centrifugation était effectuée à 514g, 10 minutes sans frein. Ensuite, les cellules étaient congelées dans le milieu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (Invitrogen) contenant [10 %

de diméthylsulfoxyde (Sigma-Aldrich) et 40 % de sérum bovin foetal (SBF) (Invitrogen Corporation Gibco Product, Grand Island, NY, USA)]. Les échantillons de $150\text{-}300 \times 10^6$ cellules par tube étaient conservés dans l'azote liquide jusqu'à l'utilisation des échantillons.

2.1.3. Enrichissement des MNCs en cellules CD34⁺

Cinq à six échantillons contenant les MNCs étaient décongelés dans un bain à 37 °C, puis mélangés pour avoir environ $1\text{-}1,5 \times 10^9$ cellules totales. Ensuite, les cellules étaient enrichies en CD34⁺ par sélection négative selon les recommandations du manufacturier (Stemsep cell Separation, Stemcell Technologies). Pour ce faire, les cellules étaient d'abord incubées pendant 15 minutes en présence d'un cocktail d'anticorps reconnaissant les antigènes de surface des cellules humaines différenciées (CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b et la glycophorine A). Ensuite, une deuxième incubation de 15 minutes était effectuée en présence d'une solution colloïdale constituée de billes magnétiques qui se lient aux anticorps du cocktail et le tout était introduit dans une colonne magnétique. Toutes les cellules qui ont été marquées par le cocktail d'anticorps étaient retenues à l'exception des cellules CD34⁺ non marquées qui étaient libérées dans un nouveau tube. Après purification, la pureté des cellules enrichies en CD34⁺ était évaluée par cytométrie (Cytomètre en flux FACSCalibur, BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Il y avait environ une population de 64 % à 85 % de cellules CD34⁺. Finalement, les cellules enrichies en CD34⁺ étaient lavées avec du PBS-Glucose et centrifugées à 1500 RPM, puis transférées dans le milieu de congélation (voir section 2.1.2).

2.2. Culture cellulaire

2.2.1. Culture de cellules CD34⁺

Les cellules enrichies en CD34⁺ étaient mises en culture dans le milieu de culture de base sans sérum, appelé aussi « Eave's base ». Ce milieu contenait de l'IMDM commercial supplémenté de 20 % BIT (albumine bovine sérique, 10 ng/mL et de l'insuline bovine pancréatique, 10 µg/mL et la transferrine humaine 200 µg/mL) plus 20 µg/mL de lipoprotéines de faible densité (LDL) et 5×10^{-5} M de 2-mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich).

En fonction de lignée cellulaire étudiée, différentes compositions de cytokine étaient utilisées. Ainsi, la condition favorisant la différenciation des cellules CD34⁺ vers la lignée des cellules érythrocytaires était composée de 20 ng/mL de SCF et 20 ng/mL d'EPO. Il est à noter que dans certaines expériences (analyse de la morphologie), le SCF et l'EPO étaient utilisés les cinq premiers jours de culture. Par la suite, pour favoriser la maturation le milieu de culture était composé d'EPO seule à 20 ng/mL.

La condition favorisant la différenciation des cellules CD34⁺ vers la lignée des cellules granulocytaires, était composée de 20 ng/mL de SCF et G-CSF. Pour la lignée de cellules monocytaires, le milieu de culture était composé de 20 ng/mL SCF et 20 ng/mL GM-CSF pendant les cinq premiers jours. Ensuite, ce milieu était remplacé par 20 ng/mL SCF et 20 ng/mL M-CSF pour permettre la maturation. En ce concerne les progéniteurs, la condition favorisant l'expansion de ces derniers était composée de 100 ng/mL FL, 100 ng/mL SCF, 100 ng/mL de TPO et 50 ng/mL d'IL-6. Toutes les cytokines provenaient de Peprotech Inc, à part EPO qui provenait de Bio-legende.

2.2.2. Mise en culture des cellules CD34⁺ au jour zéro

En fonction de l'expérience, les cellules étaientensemencées à une concentration finale de 40000 à 100000 cellules dans 1mL du milieu, puis placées dans des plateaux de 24 puits (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) ou 6 puits (Falcon, BD Labware, Franklin Lakes, NJ, USA). Par exemple, pour la lignée des cellules érythrocytaires la concentration de cellules au jour zéro était de 40000 cellules/1mL du milieu, car l'expansion des cellules de cette lignée est très rapide. Pour la lignée de cellules granulocytaires ou cellules monocytaires, la concentration cellulaire pouvait être 100000 cellules/1mL du milieu, car ces cellules ne prolifèrent pas rapidement. Les cellules étaient ensuite incubées à 37 °C et 39 °C dans un incubateur (Thermo Scientific (Revco), Marietta, OH, USA) sous atmosphère humidifiée avec 20 % O₂ (contrôlé) et 10 % de CO₂.

2.2.3. Compte de cellules, évaluation de la viabilité et dilution

En fonction de l'expérience, la viabilité et le compte des cellules étaient effectués avec du bleu de trypan 0,4 % (Invitrogen Corporation Gibco product) et à l'aide d'un hémacymètre (Hauser Scientific, Horsham, PA, USA) à des jours prédéterminés (jours 3, 5, 7, 10 et 14), une dilution était effectuée en fonction du nombre de cellules comptées.

2.2.4. Lignée cellulaire érythroleucémique (UT-7/EPO)

La lignée des cellules érythroleucémiques sont des cellules qui expriment très fortement le récepteur de l'érythropoïétine (EPO). Après avoir observé l'effet de l'hyperthermie légère sur l'érythropoïèse (cellule primaire CD34⁺). Nous avons voulu vérifier si le(s) même(s) effet(s) était(ent) observé(s) sur la lignée érythroleucémique. Pour ce faire, les cellules UT-7/EPO ont été mises en culture dans un milieu favorisant la différenciation de ces dernières. Ce milieu était composé du Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 10 % du sérum fetal bovin (FBS) et 10ng/mL d'EPO. Elles ont servi à la mise au point du protocole expérimental pour les analyses par immunobuvardage, la concentration d'inhibiteur à utiliser et aussi l'analyse de l'activité de GATA- 1 voir section 2.3.1.

2.2.5. Analyse en cytométrie en flux

Comme décrites ci-haut, les analyses étaient effectuées à des jours prédéterminés. Pour ce faire, les cellules étaient comptées (voir section 2.2.3) et un aliquot de 1×10^5 cellules était placé dans des tubes falcon de 5 mL (environ 100 μ L), la solution était complétée à 200 μ L avec de PBS-1 % FBS 0,01 % azide. Ensuite, les anticorps étaient ajoutés en fonction de la lignée cellulaire étudiée. Pour les cellules érythroïdes, la composition d'anticorps utilisé était, un anti-GPA-PE, anti-CD71-APC (BD Pharmingen).

Après l'ajout des anticorps, les cellules étaient incubées dans le noir pendant 30 minutes, puis lavées avec PBS-1 % FBS 0,01 % azide et centrifugées pendant 5 minutes à haute vitesse dans un Immufuge (Baxter, Mississauga, ON, Canada). Le culot était remis en suspension dans 0,5 mL de PBS, 1 % FBS 0,01 % azide contenant de l'iodure de propidium (concentration finale de 5 μ g/mL).

Avant l'analyse par cytométrie, une acquisition était effectuée en premier lieu. Une région était définie pour sélectionner les cellules nucléées (région R1), puis on retrouvait les plaquettes et débris dans la région définie (R2). Ces régions étaient définies par la diffraction axiale (FSC ou taille) et orthogonale (SSC ou granularité) de la lumière. Les cellules viables et mortes étaient définies par de l'iodure de propidium (PI) et la taille (FSC), ainsi cette région était définie R3. Finalement, la région R4 était définie de la même manière et qui était composée de la proportion des cellules positives ou négatives des anticorps utilisés. Pour finir, les cellules ont été analysées avec un cytomètre en flux FACSCalibur (BD Bioscience, San Jose, CA, USA), en utilisant le logiciel CELLQUEST pour l'acquisition des données. Ensuite, l'analyse des données était effectuée avec le logiciel FCS express 3 research edition (De Novo Software Los Angeles, CA). Il est à noter que pour chaque expérience, la proportion de cellules GPA⁺ était évaluée au jour 0 de culture afin de connaître l'état de la différenciation des cellules avant la mise en culture.

2.2.6. Coloration des cellules au Wright GIEMSA

La coloration GIEMSA est la méthode de référence utilisée pour colorer les frottis de sang périphérique et de la moelle osseuse. Ce colorant contient deux composants chimiques actifs en contact de l'eau, soit l'azure de méthylène qui permet de colorer le noyau en violet foncé et l'éosine qui colore le cytoplasme en violet pâle. Pour ce faire, un aliquot de cellule était déposé sur une lame à microscope (environ de 50000 cellules), puis centrifugé dans un cytopspin (Shandon, Pittsburgh, PEN, USA) à 500 RPM pendant 5 minutes. Ensuite, les cellules étaient fixées au méthanol 100 % pendant 5 minutes. Par la suite, les lames étaient séchées à la verticale pendant 15 minutes. Après, le colorant GIEMSA (dilution 1/20 dans l'eau) (Sigma, Oakville, ON, Canada) était ajouté sur les lames, pendant 15 minutes. Après, les lames ont été lavées 2 fois avec de l'eau type I, ensuite, séchées pendant 15 minutes. L'analyse des lames était effectuée au microscope (Nikon Eclipse TE 2000-5) à 100X. La morphologie des différentes cellules était évaluée à l'aide du livre *Clinical Hematology*, by A.V. Hoffbrand, J.E. Petit, distributed by Sandoz Ltd, Basle, Switzerland.

2.2.7. Expansion des progéniteurs hématopoïétiques

Les cellules isolées du SC ombilical et enrichies en CD34⁺ ont été mises en condition favorisant l'expansion des progéniteurs pendant quatre jours et incubées à 37°C et 39 °C. Aux jours 0, 4, 7, et 10, les cultures ont été comptées et des essais CFC (Colony Forming Cell) ont été effectués dans un milieu semi-solide de méthylcellulose selon la recommandation du manufacturier (Méthocult SFH4436) (Stem Cell Technologies).

Les expansions ont été calculées ainsi;

CFC Total = la somme de BFU-E+ CFU-E+ G/M/GM +GEMM

Expansion totale des CFCs; Expansion cellulaire totale au jour y X fréquence CFC au jour y/fréquence de CFC au jour 0.

Expansion des progéniteurs spécifiques (eg. CFC-GM) : Expansion cellulaire totale au jour y X fréquences CFC-GM au jour y/fréquence de CFC-GM au jour 0.

2.2.8. Analyse du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire a été étudié en estimant le contenu en ADN des cellules par cytométrie en flux (BD biosciences) en utilisant l'anticorps Ki-67 et 7-AAD (BD biosciences). Les cellules enrichies en CD34⁺ ont été mises en culture (voir section 2.2). L'analyse du cycle a été faite aux jours 0, 3, 5. Pour ce faire, les cellules ont d'abord été lavées avec PBS-Glucose une fois, ensuite fixées au paraformaldehyde 2 % pendant cinq minutes. Après les cellules ont été lavées deux fois et du triton 0.1 % a été ajouté. Ensuite, les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS-Glucose et 100 µl de PBS-1 % FBS 0.01 % azide contenant l'anticorps ki-67 couplé à FITC (BD pharmingen) était ajouté pendant 20 minutes. Après ce temps les cellules ont été lavées une fois avec 1mL PBS-1 %FBS 0,01 % azide. Ensuite, 0.5 mL de PBS 1 % FBS 0.01 % azide contenant 7-AAD à 0,25 µg (BD Pharmingen) a été ajouté. L'analyse a été effectuée par cytométrie en flux tel que décrit par Jordan et coll.[134].

2.3. Les voies JAK/STAT5a/b, PI3K/AKT et MEK/ERK1/2

La phosphorylation de certaines protéines importantes pour la différenciation et le cycle cellulaire ont été évalués. Nous avons utilisé une technique qui a été développée par Krutzik et coll. [135], et mise au point dans notre laboratoire par Carl Simard (voir

Fig.2.2). Cette méthode permet d'étudier la phosphorylation de protéines intracellulaires par cytométrie. Pour ce faire, les cellules enrichies en CD34⁺ ont été mises en culture dans le milieu Eave's base contenant EPO et SCF pendant quatre jours à 37°C. À partir du jour 4, les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS, et mises en culture dans le milieu Eave's base sans cytokine à 37 °C pendant 2 h (le but était d'éliminer ou réduire le signal induit par les cytokines). Après les cellules étaient incubées à 37 °C et 39 °C pendant 15 minutes et une heure sans cytokine, puis une partie des cellules étaient incubées à 37 °C et 39 °C en présence d'EPO pour toute la nuit. Ensuite, après l'incubation de 2 h sans cytokine, les cellules (environ 1x10⁶ cellules) ont été mises dans des tubes Eppendorf en suivant l'ordre 37 °C pendant 15 minutes, 39 °C pendant 15 minutes, 37 °C pendant 1 heure, 39 °C pendant 1 heure.

Puis, du formaldéhyde 3 % était ajouté dans chaque tube pendant 15 minutes à température pièce. Après, les cellules ont été centrifugées 5 minutes à 8000 RPM, les culots ont été remis en suspension dans 1mL de PBS et centrifugés à 8000 RPM pendant 5 minutes.

Les culots ont ensuite été remis en suspension dans 95 µL de méthanol 90 %. Par la suite, le colorant CFSE (Carboxy Fluorescein Diacetate Succinimidyl Ester) a été ajouté aux cellules en faisant différentes dilutions, pour avoir les concentrations finales de CFSE 500, 1250, 312.5, 78.12, et 15.62 µM. L'ordre était du moins dilué au plus dilué

Après avoir ajouté le colorant CFSE, les tubes ont été incubés à température pièce pendant au moins 30 minutes dans le noir. Ensuite, les cellules ont été centrifugées à 8000 RPM pendant 5 minutes. Les culots ont été remis en suspension dans 100 µL de PBS-1 % BSA puis centrifugés pendant 5 minutes à 8000 RPM. Cette étape a été effectuée 2 fois, pour enlever l'excès du colorant. Ensuite, 100 µL de PBS-1 % BSA a été ajouté aux tubes 1-4, ensuite, le tout était mélangé ensemble et centrifugé à 8000 RPM pendant 5 minutes. Le culot a été remis en suspension dans 450 µL de PBS-1 %BSA, puis séparé dans 9 tubes (40µl chacun). Ensuite, 5 µL de l'anti-CD235-PE a été ajouté dans chaque tube et 5 µL de x-phospho-protéine, ERK1/2 (pT202), AKT (pS473), STAT1 (pY701), STAT3 (pY705), STAT5a/b (pY694), NF-kBp65 (pS529), PKA-RIIα(pS473), P38 (pT180/pY182 et PLCγ2(pY759) (BD Pharmingen).

Après 30 minutes d'incubation, les tubes ont été centrifugés à 8000 RPM pendant 5 minutes. Les culots ont été remis en suspension dans 0.5mL (2 fois) dans du PBS-1 %BSA et centrifugés à 8000 RPM pendant 5 minutes. Ensuite, ces culots ont été remis en suspension dans 0.5 mL de PBS-1 %BSA et les échantillons ont été analysés par cytométrie.

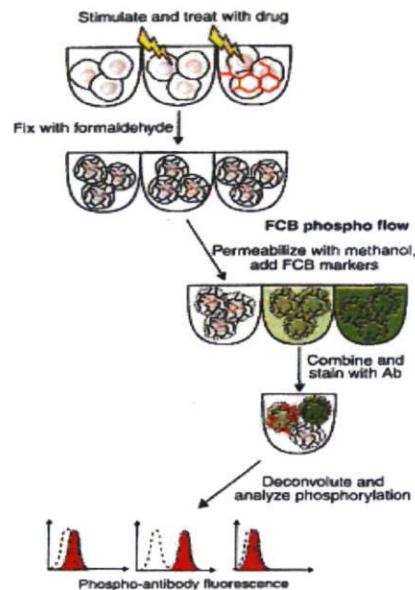


Figure 2.1: Principe de coloration au CFSE

Développée par Krutzik et coll. [135].

2.3.1. Inhibition des voies de JAK/STAT, PI3K/AKT et MEK/ERK1/2

Une inhibition de la voie JAK/STAT5a/b, PI3K/AKT et MEK/ERK1/2 a été effectuée afin de vérifier si ces voies étaient nécessaires pour l'effet de l'hyperthermie légère. Les inhibiteurs utilisés lors de ce projet sont : JAK inhibitor I (inhibiteur de JAK) (Calbiochem), LY294002 (inhibiteur de PI3K) (Cayman Chemical Company), et le PD98059 (inhibiteur de MEK) (Sigma).

Les inhibiteurs étant toxiques pour les cellules, une étude préliminaire a été effectuée afin de trouver la concentration à utiliser. Pour ce faire, les cellules UT-7/EPO ont été utilisées en utilisant différentes concentrations de ces inhibiteurs. Les concentrations

étaient de 0 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 20 μ M et 50 μ M (DMSO, JAK inhibitor I, LY294002 et PD98059). La phosphorylation des cibles JAK (STAT5a/b), de PI3K (AKT) et MEK (ERK1/2) a été vérifiée en utilisant la technique décrite en section 2.3. Trois expériences ont été faites et il s'est avéré que la concentration de 20 μ M était suffisante pour permettre une inhibition complète de la forme phosphorylée de STAT5a/b, AKT et ERK1/2. Cette concentration a donc été utilisée avec les cellules CD34⁺. Les cellules CD34⁺ ont d'abord été mises en culture pendant 4 jours (voir section 2.2). Au jour 4, les inhibiteurs ont été ajoutés à la culture puis incubées à 37 °C et 39 °C pendant deux jours. Ensuite, l'apparition de la GPA sur les cellules a été vérifiée par cytométrie en flux. Le but de la pré-incubation des cellules à 37 °C permettait d'avoir la même population de cellule avant l'ajout des inhibiteurs (protocole I).

Une autre expérience a été effectuée en mettant les cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée érythrocytaire, puis les cellules ont été incubées au jour zéro à 37 °C et 39 °C pendant 2 jours pour permettre l'expansion. Ensuite, les inhibiteurs ont été ajoutés et les cellules ont été incubées à 37 °C et 39 °C pendant deux jours. À ce jour une analyse par cytométrie en flux a été effectuée pour vérifier l'apparition de la GPA sur les cellules maintenues à 37 °C et 39 °C (protocole III).

2.4. Extraits protéiques

Afin d'évaluer l'effet de l'hyperthermie légère à court et à long terme sur l'expression des protéines, deux protocoles expérimentaux ont été développés. Pour ce faire, les cellules enrichies en CD34⁺ ont été mises à 37 °C pendant 4 jours (section 2.2). Au jour 4, les cellules étaient séparées en deux et incubées 37 °C et 39 °C pour toute la nuit (soit environ 16 heures), ceci correspondait au protocole I (effet à court terme).

Une autre culture de cellule était effectuée en parallèle, en mettant les cellules enrichies en CD34⁺ en culture en condition favorisant la lignée érythrocytaire, puis incubées à 39 °C pendant 5 jours, cette culture était le protocole II (effet à long terme de la température)

Après 5 jours de culture pour les deux protocoles, un compte cellulaire était effectué avec le bleu de trypan 0.4 % (Invitrogen Corporation Gibco product). Puis, environ 5×10^5

cellules étaient centrifugées à 1500 RPM pendant 10 minutes pour chaque condition. Les culots ont été lavés avec 1 mL de PBS et centrifugés à 1300 RPM pendant 5 minutes à 4 °C. Ensuite, les culots étaient remis en suspension dans 80 µL de PBS, puis un aliquot de 15 µL a été prélevé de chaque échantillon pour le dosage, le reste des cellules étaient lysées en ajoutant 40 µL sample buffer 3X avec DTT (cette solution contenait 187.5mM Tris-HCl, 150mM DTT, 6 % SDS, 6 % glycérol et 0.3 % bleu bromophénol).

2.4.1. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Le dosage des protéines a été effectué par la méthode de Bradford à partir des aliquots prélevés en section 2.4. Le concentré de la solution de Bradford contenant le *réactif Bio-Rad Protein assay* a été ajouté directement sur les cellules. Afin d'évaluer la concentration des protéines dans la solution, une courbe standard a été effectuée en utilisant différentes concentrations de BSA 1 mg/mL (0 µg à 20 µg) et le réactif de Bradford a été ajouté à ces solutions. La densité optique a été mesurée avec le lecteur de plaque à une longueur d'onde de 595 nm. Le logiciel déterminait directement les concentrations des protéines à l'aide des résultats de la courbe standard. Pour connaître la concentration des protéines dosées, on divisait la concentration donnée par le logiciel sur la quantité de protéine qui a été utilisée pour le dosage (5 µL). Ensuite, la concentration finale était déterminée en tenant compte du volume de départ (120 µL).

2.4.2. Analyse des protéines par immunobuvardage

Afin de vérifier le niveau d'expression des protéines de choc thermique (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90) et GATA-1(pS310). Des analyses par immunobuvardage ont été effectuées. Pour ce faire, les extraits de protéine (voir section 2.4) ont été utilisés. En fonction de la quantité de protéine dosée, quelques µg de protéines (généralement 2-6 µg) ont ensuite été séparés sur gel SDS-PAGE 10 %. Avant le dépôt, les échantillons ont été chauffés à 95 °C 5 minutes, puis refroidis sur la glace. Une électrophorèse a été effectuée à 120 volts pendant 1-1h20 dans le tampon de migration (0,1 % (p/v) SDS, 25mM Tris et 192mM de glycine), un standard de poids moléculaire a aussi été utilisé (Kaléidoscope Prestained Standard; BIO-RAD). Ensuite, les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF (Fisher) pendant une heure à 100Volt 4 °C, dans le tampon de

transfert qui était composé de [12.12 g Tris (25mM), 57.6 g glycine (192mM), 400 ml méthanol]. Après, les membranes ont été bloquées pendant une heure dans la solution de blocage à température pièce. Pour les phospho-protéines, la solution de blocage était composée de TTBS (20 mM TRIS pH7.6, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween-20) 3 % BSA + 3 % gélatine de poisson. Pour les HSPs, la solution de blocage était composée de TTBS + 5 % de lait. Les membranes étaient ensuite lavées avec du TTBS 3 fois pendant 5 minutes. Les HSPs, GATA-1(pS310) (1/3000) (Signalway Antibody), GATA-1 total (1/5000) (Santa Cruz), HSF1 (pS326) (Abcam) ont ensuite été détectés grâce aux anticorps polyclonaux de lapin anti-HSPX humain (les anticorps HSP27 (1/10000), HSP60 (1/20000) et HSP90 (1/10000) ont été généreusement offerts par le Dr Tanguay Robert du département de biologie moléculaire, de biochimie médicale et de pathologie, de l'Université Laval). Les membranes ont été incubées toute la nuit à 4 °C.

Le lendemain les membranes ont été lavées 3 fois avec du TTBS pendant 5 minutes, puis les anticorps secondaires couplés à la peroxydase ont été ajoutés. Tous les anticorps contre les HSPs ainsi que GATA-1 (pS310) étaient produits chez le lapin, donc un anti-lapin produit chez la chèvre (Jackson Immuno Research) a été utilisé.

À la fin, une réaction de chimiluminescence a été effectuée pour détecter les protéines en suivant les recommandations du manufacturier (GE Healthcare). Un contrôle d'actine était effectué à chaque expérience. Pour ce faire, un Anti-actine (rabbit Sigma-Aldrich) était ajoutée sur les membranes (dilution 1/2000 dans la solution de blocage) pendant 1 heure à température pièce. Ensuite, les membranes étaient lavées et un anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase était ajouté pendant 1 heure. Les membranes étaient lavées 3 fois avec du TTBS pendant 5 minutes. À la fin, une réaction de chimiluminescence a été effectuée pour détecter la protéine.

2.5. Analyse de l'activité transcriptionnelle de GATA-1

Le plasmide utilisé provenait du laboratoire de Dr Adam N Goldfarb (Department of Pathology, University of Virginia), il y avait un contrôle négatif sans insert et un deuxième plasmide avec comme insert le promoteur humain (région -598 à 32) de α Ib (PGL3 α Ib) [136]. Ce promoteur est activé fortement par GATA-1.

2.5.1. Transformation bactérienne par électroporation

La bactérie E.cloni (Lucigen[®] Corporation, Middleton, WI USA) a été utilisée. Pour ce faire, un échantillon de E.cloni (25 µL) fraîchement sortie de -86 °C a été mise dans la glace pendant 20 minutes. Ensuite, 10 ng cellule/ADN a été mis sur les cellules bactériennes, puis mélangé ensemble. Ensuite, cette culture a été transférée dans une cuvette de 0.1 cm (Invitrogen, Burlington, ONT, Canada). L'ADN plasmidique a été dosé au préalable au Nanodrop. La cuvette a ensuite, été placée dans l'appareil à électroporation (Gene pulser[™], BIORAD, Missisauga, ONT, Canada). Un électrochoc a été effectué à 6000 hms, 10 µF et 1800Volt pendant 10 secondes. Ensuite, la culture a été transférée dans un Eppendorf et 1mL de solution Recovery Medium (Lucigen[®] Corporation, Middleton, WI USA) a été ajouté. Le mélange a été incubé à 37 °C, 250 RPM pendant 1 h à avec agitation (Innova TM4000, New Brunswick CO inc; Edison, NJ, USA). Ensuite, 100 µL de cette culture a été mis dans une boîte de pétri LB-agar ampicilline (5g de Trypton, 5g de Yeast Extract, 5 g de NaCl (fisher) , 7,5 g d'agar et 100 µg/ml d'Ampicilline (Sigma)). La boîte de pétri a été incubée pour la nuit (environ 16 h) dans un incubateur à 37°C (Shel Lab : Cornelius, Oregon, USA).

2.5.2. Mini-préparation et Midi-préparation d'ADN plasmidique

Afin de vérifier si le plasmide contenait l'insert αIIb, un extrait d'ADN a été effectué. Pour ce faire, le kit de QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN a été utilisé et les instructions du fabricant ont été suivies.

Après avoir vérifié que le plasmide contenait l'insert désiré, le kit de HiSpeed Plasmid Midi de QIAGEN a été utilisé pour avoir une quantité suffisante d'ADN. Les instructions du fabricant ont été suivies pour réaliser cette étape.

2.5.3. Congélation de la culture bactérienne

Le reste de la culture dans la section 2.6.2 a été conservé, en ajout 500 µL de glycérol 30 % stérile à 500 µL de la suspension bactérienne et conservée à -80°C.

2.5.4 Digestion avec les enzymes de restriction

Le laboratoire qui a nous a remis les plasmides nous a aussi fourni les sites d'insertion du promoteur α IIb. La digestion du plasmide contenant l'insert a été faite avec XhoI et HindIII (Biolabs). Le tampon utilisé était celui fourni par le fabricant, la concentration finale du tampon devait être de 1X. Une digestion a été faite par enzyme, et aussi une double digestion a été effectuée, le contrôle sans insert a aussi été digéré par les mêmes enzymes les instructions du fabricant ont été suivies pour réaliser cette étape.

2.5.5. Électroporation des cellules UT-7/EPO

Après avoir obtenu une quantité suffisante d'ADN plasmidique par Midi-préparation plasmidique, environ 10 millions de cellules UT-7/EPO ont été mises en culture (section 2.2.4) pendant 4 jours. À ce jour, environ, les cellules ont été lavées avec du PBS-Glucose et les culots de 5 millions de cellules ont été remis en suspension dans 800 μ L de milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium). Pour chaque condition, 15 μ g de l'ADN plasmidique de PGL3 (ie PGLCTL, ou PGL3 α IIb) et 1 μ g de eYFP ont été mélangés avec les cellules puis transféré dans une cuvette 0.4 cm (Invitrogen, Burlington, ONT, Canada). La cuvette a ensuite été placée dans l'appareil à électroporation (Gene pulserTM, BIORAD, Mississauga, ONT, Canada). Ensuite, un électrochoc a été effectué pour insérer les ADN dans les cellules à ∞ Ohms, 60 μ F et 280Volt pendant 10 secondes.

2.5.6. Essai de la luciférase

Les cellules de section 2.5.6 ont été incubées à 37 °C et 39 °C pendant 48h. Ensuite, les cellules transfectées ont été analysées par cytométrie afin de vérifier le pourcentage de cellules à eYFP positive. Après, l'essai du test de la luciférase a été effectué. Le kit de la compagnie proméga a été utilisé selon la recommandation du manufacturier (Promega Corporation, catalogue E4030). Immédiatement l'analyse a été effectuée au luminomètre une minute selon les recommandations du manufacturier (The Thermo Scientific Luminoskan® Ascent microplate luminometer). L'appareil était déjà programmé pour ce genre d'essai (une minute pour faire l'essai).

2.5.6.1. Analyse des données de l'essai de la luciférase

Les données étaient analysées de la façon suivante : tout d'abord, l'ADN plasmidique de eYFP a été utilisé pour évaluer l'efficacité de la transfection (mesure de la proportion de cellules eYFP+ par cytométrie). Les données du test de la luciférase étaient divisées par le pourcentage de cellule eYFP positive. Ensuite, la valeur obtenue par le luminomètre avec le plasmide avec insert était divisée par celle du CTL (vecteur luciférase sans promoteur).

2.6. Analyse statistique

Tous les résultats ont été analysés avec le logiciel Microsoft Excel, les niveaux de confiances ont été déterminés par le Test Student (t). Le seuil de signification était $p < 0.05$.

2.7. Calcul de la proportion de cellules à GPA+ à 39 °C

$$\text{Augmentation de GPA+ (39 °C)} = \left(\frac{\%GPA+(39^{\circ}C) - \%GPA+(37^{\circ}C)}{\%GPA+(39^{\circ}C)} \right) \times 100$$

2.8. Calcul de perte de l'effet de l'HL sur la différenciation

Soit EHL : effet de l'HL. Ce dernier était calculé comme suit :

$$\text{EHL (contrôle DMSO)} = \% \text{ GPA+ à } 39^{\circ} \text{C} - \% \text{ GPA+ à } 37^{\circ} \text{C}$$

En présence des inhibiteurs :

$$\Delta \text{GPA (x inhibiteur)} = \% \text{ GPA+ (cellules à } 39^{\circ} \text{C avec inhibiteur x)} - \% \text{ GPA+ (cellules à } 37^{\circ} \text{C avec inhibiteur x)}.$$

Ensuite la perte de l'EHL était calcul de la façon suivante :

$$\text{Perte EHL} = (\text{EHL} - \text{GPA (x inhibiteur)}) / \text{EHL} * 100$$

3. Résultats

Les études antérieures réalisées par notre équipe avaient permis de montrer que l'incubation des cellules souches enrichies en CD34⁺ issues du SC ombilical à 39 °C favorisait une augmentation de l'expansion totale, ainsi qu'une accélération de la différenciation et de la maturation des cellules vers la voie des cellules mégacaryocytaires

Cependant, tous les travaux effectués jusqu'à présent sur l'effet de l'hyperthermie légère étaient concentrés sur la lignée des cellules mégacaryocytaires. Par conséquent, il restait à caractériser l'effet de l'hyperthermie légère sur les autres lignées de la voie myéloïde. Pour ce faire, il fallait vérifier si l'incubation des cellules CD34⁺ issues du SC à 39 °C en condition favorisant la différenciation de la lignée des cellules érythrocytaires, granulocytes et monocytes montrait le même résultat, que ce observé avec les Cellules MKs.

Afin de faciliter la compréhension des résultats de ce projet, tous les résultats de la lignée des cellules érythroïdes seront présentés en premier. Ensuite, les résultats de l'effet de l'hyperthermie légère sur les cellules granulocytes et monocytes seront présentés. Pour finir, les résultats de l'effet de l'hyperthermie légère sur l'expansion des progéniteurs suivront.

3.1. Impact de l'hyperthermie légère sur l'érythropoïèse

3.1.1. Impact à 39°C sur l'expansion des cellules érythrocytaires

Dans le but de mieux accomplir nos expériences, nous avons effectué des études préliminaires permettant de choisir les jours d'analyses. Les résultats de ces expériences nous ont permis de choisir les jours 3, 5, 7, 10, 14 comme étant les jours de comptes cellulaires, dilutions ainsi que l'analyse par cytométrie en flux. Dès lors, toutes nos expériences concernant la différenciation, l'expansion et de la maturation ont été réalisées en 14 jours de cultures.

L'incubation des cellules CD34⁺ (en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée érythroïde) à 39 °C favorise une augmentation de l'expansion des cellules. En effet, à partir du jour 5 de culture, un accroissement de l'expansion des cellules en condition favorisant la différenciation de la lignée érythrocytaire était observé pour les cultures maintenues à 39°C (Fig.3.1A) comparativement à celles maintenues à 37 °C.

L'analyse de la Fig.3.1B de l'expansion totale des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation de la lignée érythrocytaire en fonction du jour de culture, montre aussi une augmentation de l'expansion des cellules et statistiquement significative ($p < 0.01$) dès le début de culture soit une expansion de 25.3 ± 3.5 (moyenne \pm ETM) fois à 39 °C comparativement au contrôle à 37 °C soit une expansion de 7.4 ± 1.5 fois au jour 5.

Finalement, l'analyse de la Fig.3.1C montre une augmentation de l'expansion totale de cellules GPA⁺ à 39 °C à partir du jour 3 ($p < 0.01$) par rapport au contrôle à 37 °C. Ces résultats montrent que l'impact de l'hyperthermie légère sur l'expansion des cellules CD34⁺ vers la voie des cellules érythroïdes est observé entre 3-5 jours, plus tôt que celui observé avec la lignée des cellules MKs soit au jour 7. En effet, les travaux réalisés par Pineault et coll. [116], ont permis de mettre en évidence que l'hyperthermie légère favorise l'augmentation de l'expansion des cellules CD34⁺ vers la voie des cellules Mks en 7 jours de cultures des cellules à 39 °C.

Par ailleurs, l'hyperthermie légère n'avait pas d'effet sur la viabilité cellulaire des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée érythrocytaire, sauf en fin de culture où la viabilité était légèrement diminuée pour les cultures maintenues à 39 °C par rapport à celles maintenues à 37 °C (résultats non montrés).

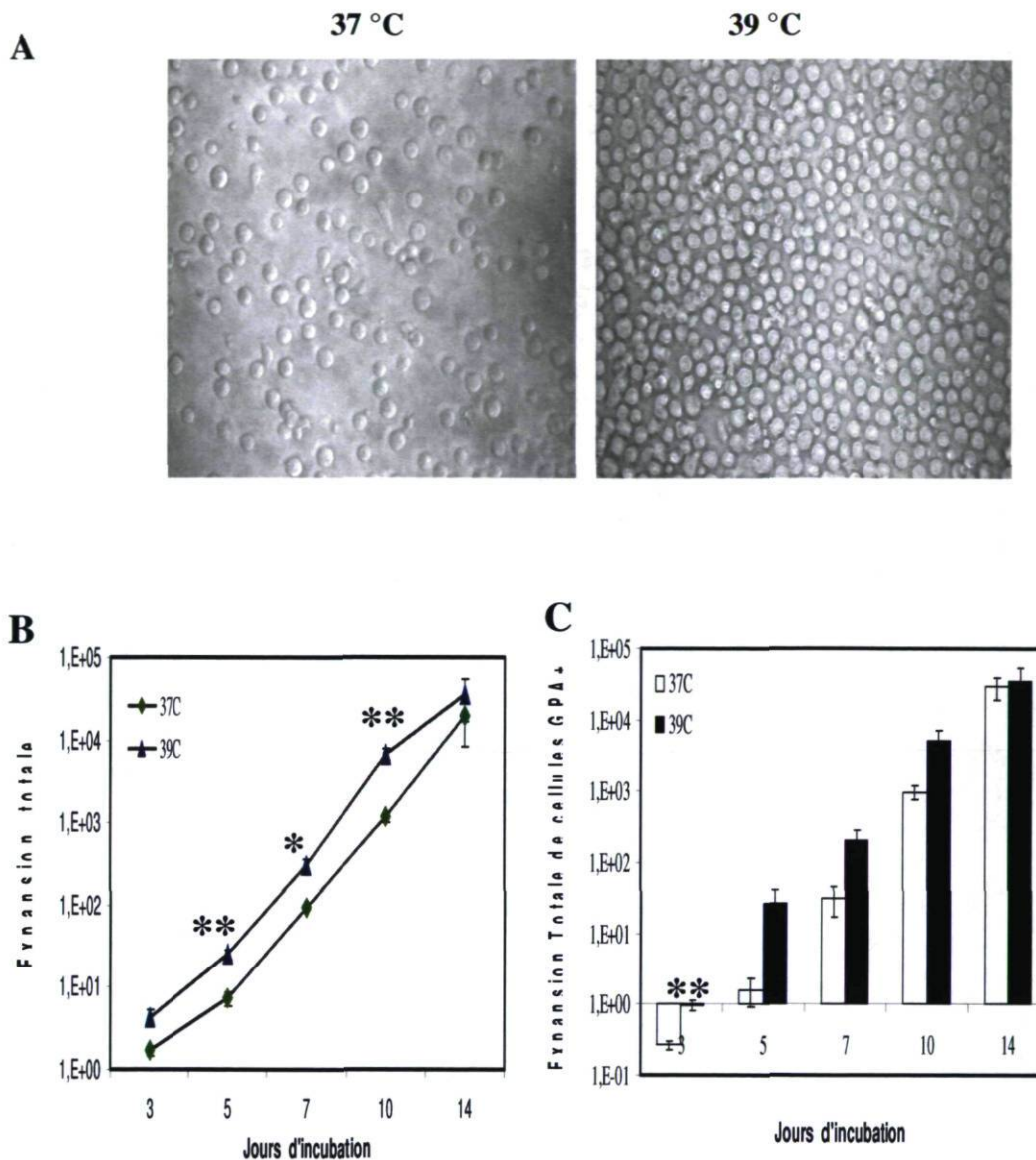


Figure 3.1: Impact à 39 °C sur l'expansion des cellules de la lignée érythrocytaire

A : Photo de culture de cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée érythrocytaire au jour 5, données d'une expérience représentative.

B : Expansion totale sur une période de 14 jours des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée érythrocytaire (MOY ± ETM, **p<0.01, n=3).

C : Expansion totale sur une période de 14 jours des cellules GPA⁺. Données de 3 expériences indépendantes (MOY ± ETM, **p<0.01, n=3).

3.1.2. Impact à 39 °C sur la différenciation des cellules érythroïdes

Après avoir vérifié l'effet de l'hyperthermie légère sur l'expansion des cellules CD34⁺ vers la voie des cellules érythroïdes, nous avons aussi voulu vérifier son effet sur la différenciation des cellules CD34⁺ en cellule érythroïde. Pour ce faire, les cellules enrichies en CD34⁺ ont été mises en culture en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée érythrocytaire pendant 14 jours. Nous avons effectué des analyses par cytométrie, afin de vérifier l'apparition de l'antigène de surface des cellules érythroïdes : la GPA (cultures maintenues à 37 °C et à 39 °C). Selon ce qui peut être observé sur la Fig.3.2A-B, on observe que la proportion de cellules GPA⁺ est très négligeable soit 1,8 %. Après la mise en culture des cellules, on remarque que la proportion de cellules à GPA⁺ est plus élevée à 39 °C comparativement à 37 °C, une augmentation de 30 % et 15 % de plus de cellules sont GPA⁺ à 39 °C au jour 5 et 7 respectivement par rapport au contrôle (voir section 2.8 pour détail des calculs). Ces résultats évoquent donc que l'hyperthermie légère permet une accélération de la différenciation de cellules érythroïdes puisque nous avons observé une apparition précoce de cellules GPA⁺ dans les cultures maintenues à 39 °C. L'accélération de la différenciation des cellules à 39 °C était hautement significative ($p < 0.01$) aux jours 5 et 7 de culture, après il n'y a pas de différence significative de cellules GPA⁺ entre les cultures maintenues à 37 °C et 39 °C. De plus, une forte augmentation de la population de cellule double positive CD71/GPA était aussi observée pour les cultures maintenues à 39 °C par rapport au contrôle à 37 °C (Fig.3.2A).

Ces résultats vont dans le même sens que ceux observés avec la lignée des cellules MKs. En effet, Pineault et coll. [116], avait montré une accélération de la différenciation des cellules MKs (apparition rapide du phénotype de différenciation des Cellules MKs : CD42b) après 4 jours de culture des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée des Cellules MKs à 39 °C. De façon globale, l'hyperthermie légère favorise une accélération de la différenciation ainsi qu'une augmentation de l'expansion des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation des cellules CD34⁺ vers la lignée érythrocytaire.

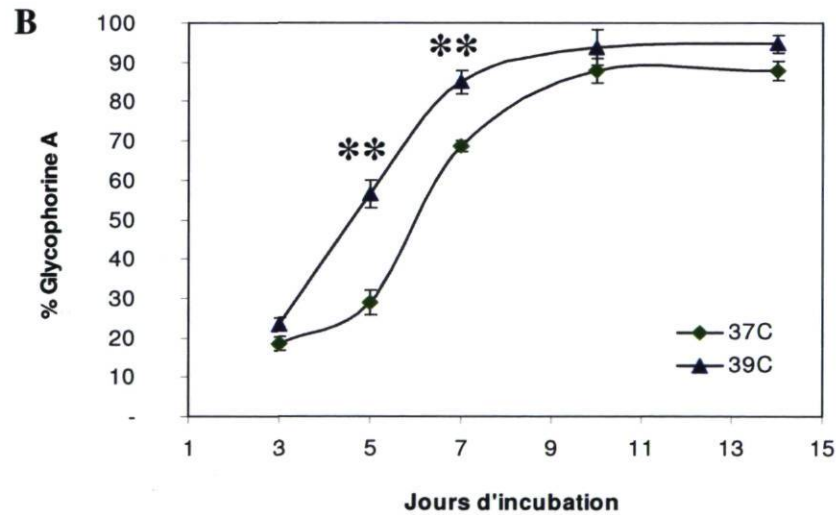
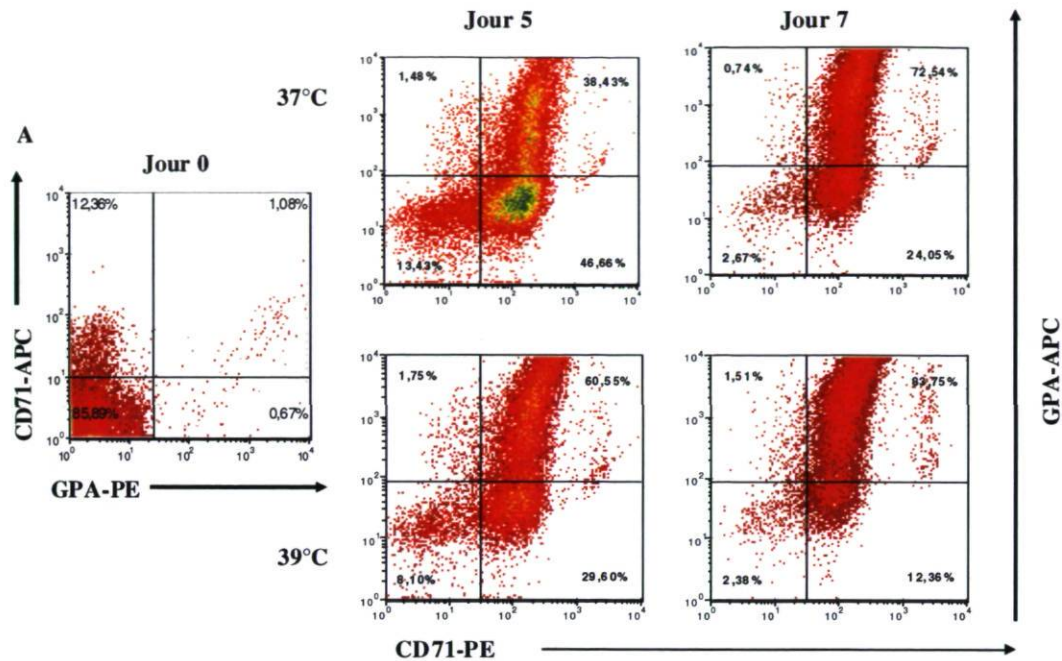


Figure 3.2: Impact à 39 °C sur la différenciation des cellules érythroïdes

A : Apparition des marqueurs de surface GPA et CD71 sur les cellules en culture maintenues à 37 °C et 39 °C aux jours 5 et 7. Données d'une expérience représentative (n=3). **B :** Progression de l'apparition de l'antigène de surface la GPA sur une période de 14 jours pour les cultures maintenues à 37 °C et 39 °C (**p<0.01). MOY ± ETM de 3 expériences indépendantes.

3.1.3. Impact à 39°C sur la maturation des cellules érythrocytaires

Les expériences précédentes confirmaient une apparition précoce du phénotype GPA pour les cultures maintenues à 39 °C. Par conséquent, il était donc possible que les cellules incubées 39 °C soient plus avancées dans la maturation comparativement au contrôle à 37 °C.

Dans l'intention de vérifier cette hypothèse, nous avons effectué des analyses morphologiques pour évaluer les différentes étapes de différenciation des cellules de la lignée érythrocytaire. Les cellules CD34⁺ ont été incubées à 37 °C et 39 °C en utilisant une condition favorisant la différenciation vers la lignée des cellules érythroïdes. Ensuite, les cellules ont été colorées avec le colorant Wright GIEMSA, puis analysées au microscope.

Lors de la différenciation des cellules érythroïdes, les précurseurs des cellules érythroïdes nucléés progressent pour former des proérythroblastes et érythroblastes basophiles, polychromatophiles, pycnotiques, réticulocytes (cellules énuclées).

Sur la Fig 3.3A à partir du jour 10, un changement morphologique a été observé pour les cultures maintenues 39 °C par rapport au contrôle à 37 °C. En effet, la majorité des cellules à 39 °C étaient des cellules pycnotiques, alors que la majorité des cellules maintenues à 37 °C n'étaient pas encore rendues à cette étape de la différenciation.

Au jour 7 de culture, 30 % des cellules étaient des cellules érythroblastes basophiles (cellules érythrocytes immatures) à 39 °C (Fig.3.3C) par rapport à une proportion de 60 % de cellules érythroblastes basophiles à 37 °C (Fig.3.3B). Ceci suggère que la majorité des cellules nucléées à 37 °C étaient encore au premier stade de différenciation des cellules érythroïdes par rapport à celles maintenues à 39 °C.

Un autre phénomène intéressant a été observé au même jour, où 60 % des cellules étaient des cellules érythroblastes polychromatophiles (cellules érythrocytes moyennement matures) à 39 °C comparativement à environ 40 % de cellules qui étaient rendues au même niveau de la différenciation à 37°C. Ainsi, la majorité des cellules maintenues à 39 °C étaient donc plus avancée dans la maturation par rapport au contrôle à 37 °C

Après 10 jours de culture des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation vers la lignée des cellules érythroïdes maintenues à 37 °C et 39 °C, un autre fait

intéressant a été observé. À cet égard, il y avait une proportion de $42\% \pm 13$ de cellules qui étaient pycnotiques (étape avant l'énucléation) à $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig.3.3C) comparativement à seulement $26\% \pm 13$ de cellules au même stade de différenciation à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig.3.3B).

Finalement, à la fin de culture au jour 14, un dernier phénomène très intéressant a également été observé. Une proportion de $15\% \pm 1.7$ de cellules étaient réticulocytes (cellules énuclées) à $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($p < 0.01$), par rapport à $5\% \pm 1.7$ de cellules qui étaient rendues à la même étape à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ces résultats intéressants suggèrent que l'incubation des cellules à $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ permet une accélération de la maturation des cellules érythroïdes.

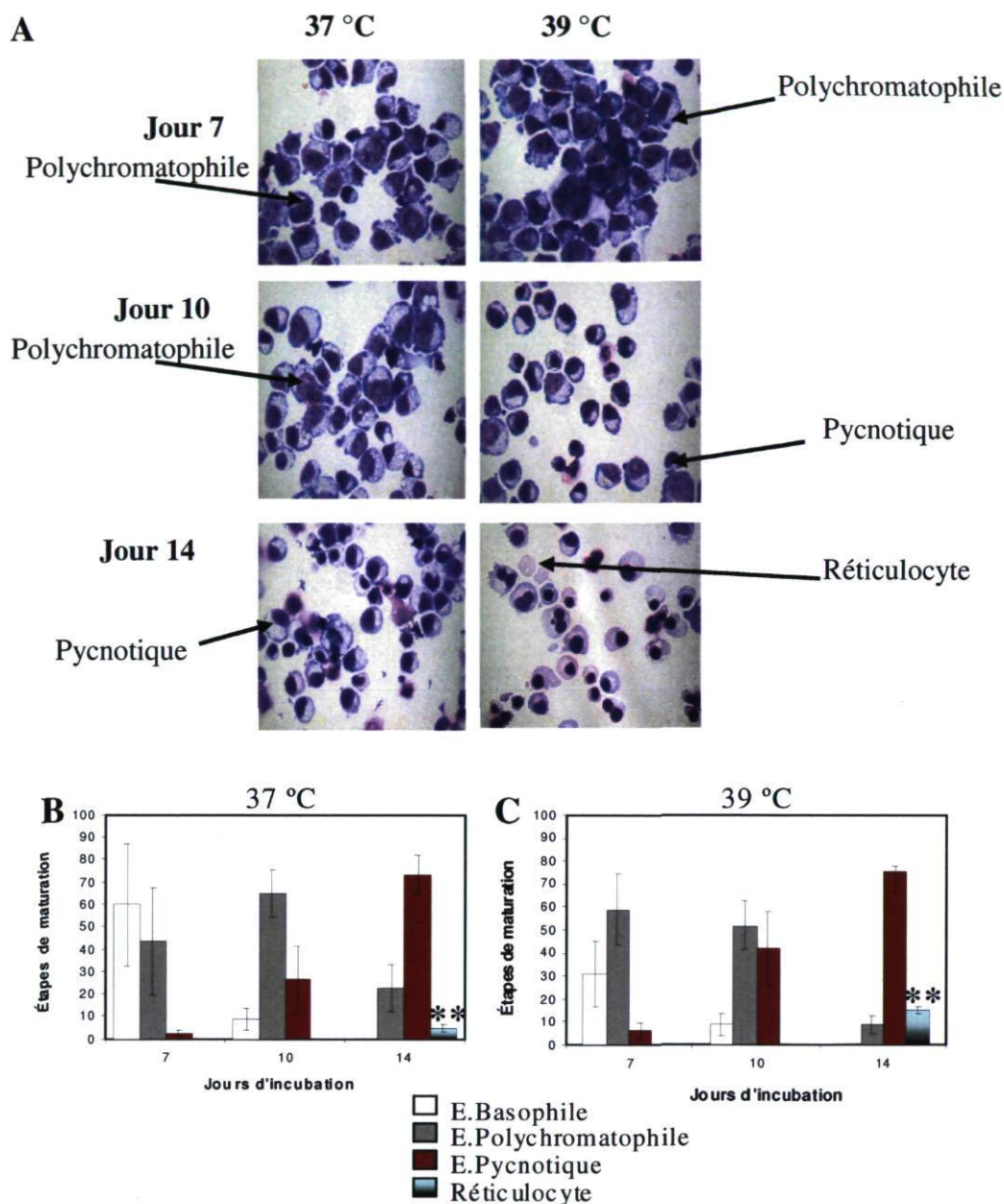


Figure 3.3: Impact à 39 °C sur la maturation des cellules érythroïdes

Les cellules CD34⁺ ont été cultivées pendant 14 jours dans un milieu favorisant la différenciation des cellules érythroïdes pendant les 5 premiers jours, et avec EPO seulement pour les 9 derniers jours. Incubation faite soit à 37 °C et 39 °C. Aux jours, 7, 10 et 14, les cellules ont été colorées au GIEMSA puis analysées au microscope **A** : photo de cellules érythroïdes aux jours 7, 10 et 14 à 37°C et 39°C **B** : Distribution des cellules érythroïdes dans les différentes étapes de maturation en fonction du temps à 37 °C MOY ± ETM. **C** : Distribution des cellules érythroïdes dans les différentes étapes de maturation des cellules érythroïdes en fonction du temps à 39 °C (**p<0.01). MOY ± ETM. Données de 3 expériences indépendantes.

3.1.4. Impact à 39°C sur l'entrée en cycle cellulaire des cellules CD34⁺

Nos résultats montraient un accroissement de l'expansion des cellules maintenues à 39°C, ce phénomène observé pouvait être dû à une modification de la vitesse de l'index de prolifération de ces cellules, et ce, en affectant le cycle cellulaire.

Ainsi, l'étape suivante des travaux était de vérifier si l'incubation des cellules à 39 °C permettait une entrée plus rapide des cellules CD34⁺ en cycle cellulaire. Pour vérifier cela, les cellules CD34⁺ ont été mises en culture en condition favorisant de différenciation des cellules de la lignée érythrocytaire et incubées à 37 °C et 39 °C. La proportion de cellules en G0, G1 et S/G2/M ont été évaluées par cytométrie en suivant l'expression de l'antigène Ki-67 (exprimé par les cellules en cycle actif) tel qu'il a été décrit par Jordan et coll. [134].

L'analyse de la Fig.3.4B permet d'observer que la majorité des cellules CD34⁺ étaient quiescente (G0) ou encore en G1 au jour 0. Après 3 jours de culture, un fait très intéressant de l'effet de l'hyperthermie légère sur le cycle cellulaire a été observé. En effet, à ce jour, il y avait une diminution de 15 % de la proportion de cellules en G0 à 39 °C (Fig.3.4D) (45.3 % des cellules en G0 à 39 °C) par rapport au contrôle à 37 °C (53.5 % de cellule en G0) (Fig.3.4C). Ce qui semblait indiquer que les cellules maintenues à 39 °C entraient plus rapidement en cycle. Au même jour de culture, une augmentation de population des cellules en S/G2/M à 39 °C (29.8 % ± 0.51 de cellule en S/G2/M) a aussi été observée comparativement à celles maintenues à 37 °C (12.3 % ± 0.2)(Fig.3.4E), il est également important de noter que cette différence était statistiquement significative $p < 0.01$ (n=3). Finalement, après 5 jours de culture, la majorité des cellules étaient en cycles à 37 °C et 39 °C, par contre, il y avait une légère augmentation ($p < 0.01$ n=3) de la proportion des cellules en S/G2/M à 39 °C (41.5 % ± 0.7) par rapport à 37 °C (38.5 % ± 0.26) (Fig.3.4F). Ainsi, de façon générale, les cellules incubées à 39 °C entraient plus tôt en cycle (de G0 en G1, et G1 en S/G2/M)), et la proportion de cellules en S/G2/M étaient significativement plus élevées pour les cellules maintenues à 39 °C lors des 5 premiers jours de culture.

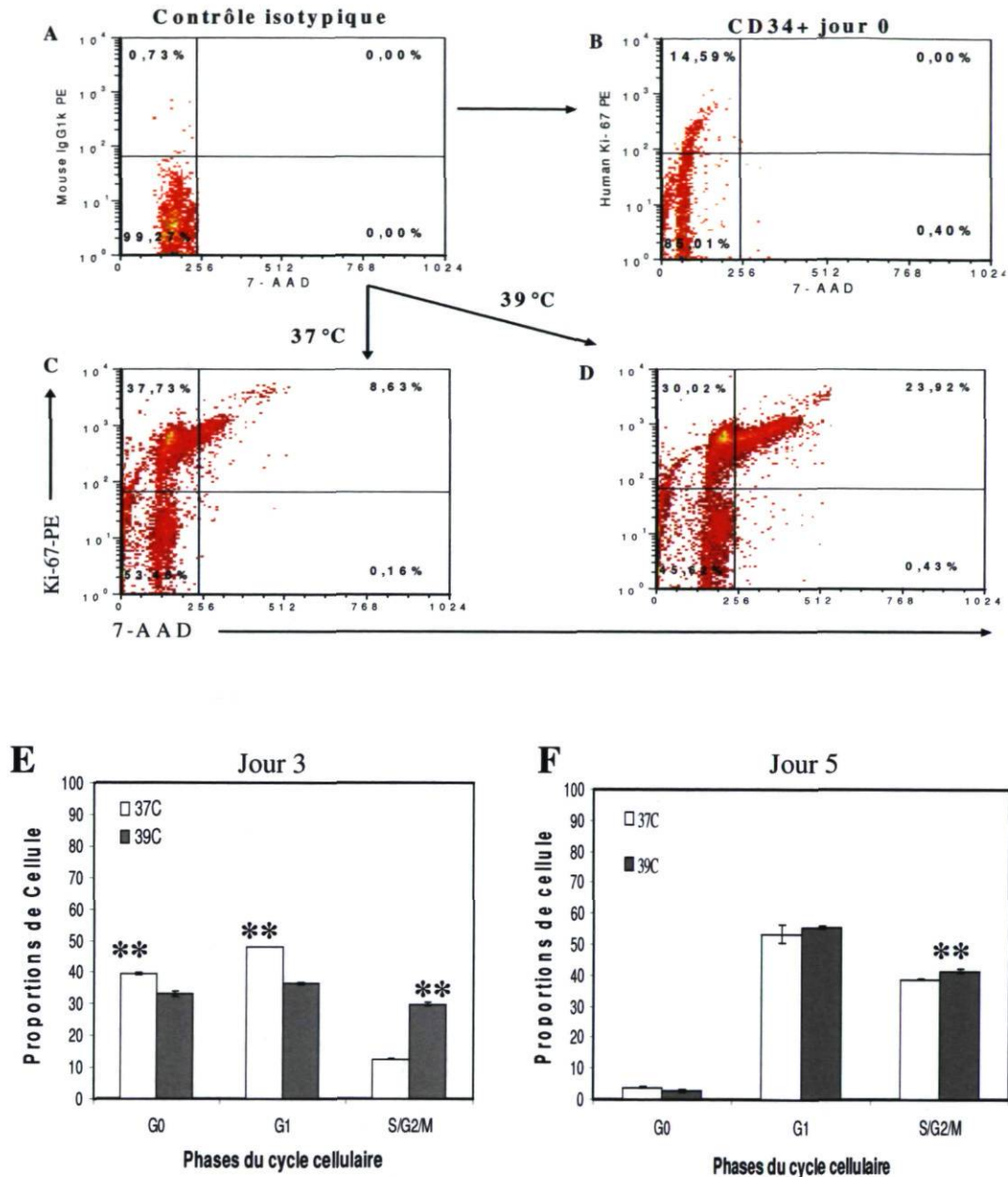


Figure 3.4: Impact à 39 °C sur le cycle cellulaire des cellules érythroïdes

A : Contrôle isotypique pour le marquage de Ki-67. **B** : Étude du cycle cellulaire des cellules CD34⁺ au jour 0. **C** : Apparition du phénotype Ki-67 au jour 3 à 37 °C **D** : Expression de Ki-67 au jour 3 à 39 °C **E** : Proportion de cellules en fonction des différentes étapes du cycle cellulaire au jour 37°C et 39°C (**p<0.01 n=3). **F** : Proportion de cellules en fonction des différentes étapes du cycle au jour 5 à 37 °C et 39 °C (**p<0.01 n=3). MOY ± ETM de 3 expériences indépendantes. Donnée d'une expérience représentative présentée en A-D (n=3).

3.2. Mécanisme potentiellement impliqué à 39°C sur l'érythropoïèse

Le ou les mécanisme(s) impliqué(s) dans l'effet de l'hyperthermie légère sur la différenciation et l'expansion des cellules érythroïdes n'est ou ne sont pas encore connu(s). Nous avons suivi trois étapes pour mieux caractériser le ou les mécanisme(s) impliqué(s). La première étape était d'établir un protocole expérimental hautement reproductif qui pouvait servir de plateforme pour identifier les molécules clés impliquées.

Ce protocole consistait à mettre cellules CD34⁺ en expansion dans un milieu favorisant la différenciation en cellules érythroïdes pendant 4 jours à 37 °C, afin de produire une grande quantité de cellules érythroïdes plus ou moins aux mêmes stades de maturation. Par la suite ces cellules pouvaient être incubées à 37 °C ou 39 °C pendant 15 minutes ou 1 heure (protocole I), ou encore toute la nuit (protocole II). Cela permettait de déterminer l'impact de l'hyperthermie légère à court et moyen terme, respectivement. Pour les cultures incubées toute la nuit à 37 °C et 39 °C, une analyse de l'expression de GPA par cytométrie était effectuée afin de vérifier si l'effet de l'hyperthermie légère sur la différenciation était conservé. Ces analyses ont permis de montrer qu'une incubation d'une nuit à 39 °C était suffisante pour obtenir un effet prononcé de l'hyperthermie légère sur la différenciation puisqu'il y avait une augmentation de 12 % de la proportion de cellules GPA⁺ à 39°C (Fig.3.5C- D). Ces deux protocoles ont donc été utilisés pour l'analyse de l'effet de l'hyperthermie légère sur la modulation de la signalisation intracellulaire en utilisant la technique de cytométrie développée par Krutzik et coll. [135] et décrite en section 2.3. Il est à noter que concentration standard de cytokine a été doublée (soit 40 ng/mL de SFC et 4 U/mL d'EPO).

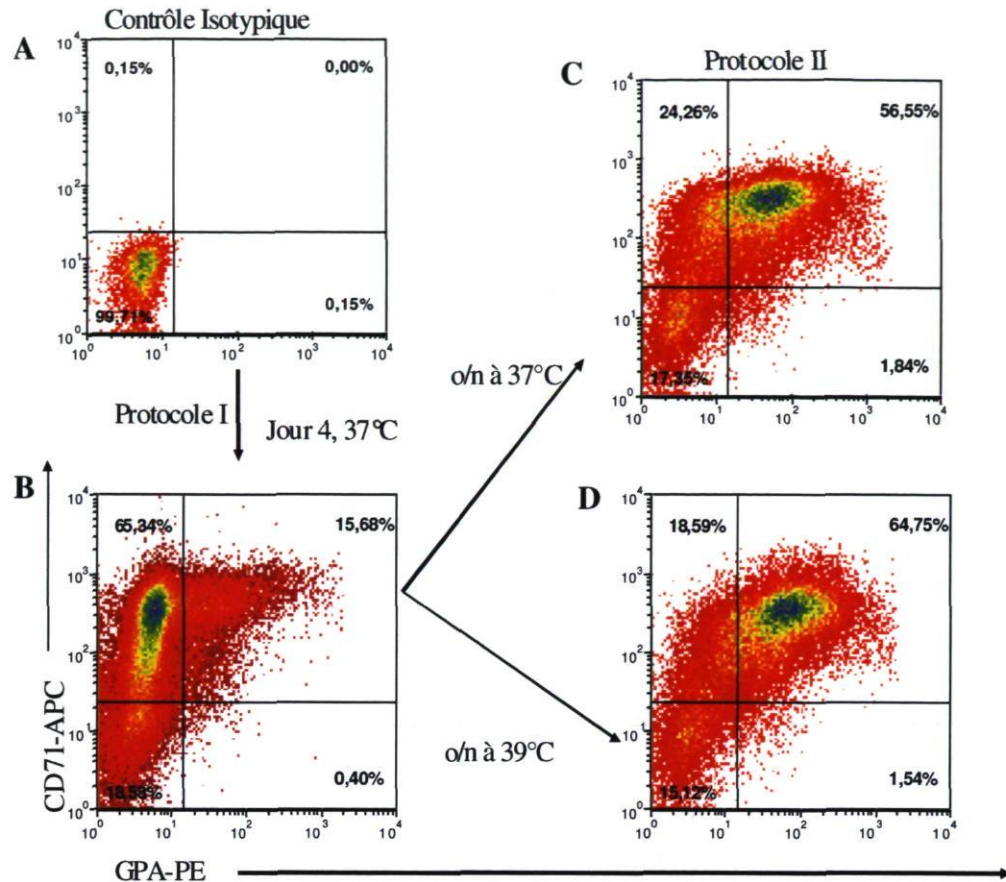


Figure 3.5: Protocoles expérimentaux à 39°C à court terme (15 minutes et une 1 h) et à moyen terme (o/n) des cellules en condition érythroïdes.

Les cellules CD34⁺ ont été mises en expansion pendant 4 jours à 37 °C **A** : Contrôle isotypique. **B** : Apparition du phénotype GPA au jour 4 pour les cultures maintenues à 37 °C **C** : Apparition du phénotype GPA au jour 5 pour les cultures maintenues à 37 °C toute la nuit. **D** : Apparition du phénotype GPA au jour 5 pour les cultures maintenues à 39 °C toute la nuit. Données d'une expérience représentative présentées.

La seconde étape était de déterminer quelles molécules pouvaient être potentiellement impliquées dans la médiation de l'effet de l'hyperthermie légère. Dans un premier temps, nous avons analysé les molécules impliquées dans la transduction du signal induit par l'EPO-R (section 1.3.6). Ensuite, nous avons sélectionné les protéines qui assurent un rôle important dans la différenciation, la survie et la prolifération des cellules érythroïdes. La question à résoudre à ce niveau était de savoir si l'hyperthermie légère favorisait

l'activation de ces protéines, en permettant peut-être la dimérisation du récepteur d'EPO en absence d'EPO (protocole I) et en présence d'EPO (protocole II).

Dans le but de mieux réaliser notre étude, nous nous sommes basés sur les résultats des travaux de Lin et coll. [129]. Ces auteurs avaient apporté que l'hyperthermie légère favorisait l'activation du récepteur d'EGF sans la présence de cette cytokine. Par conséquent, il était donc possible que l'hyperthermie légère puisse aussi permettre l'activation du récepteur d'EPO en absence d'EPO. Le protocole expérimental I était idéal pour clarifier cette hypothèse. En ce qui concerne, le protocole II, ce dernier nous permettait de vérifier s'il y avait une différence de la forme phosphorylée des protéines sélectionnées et incubées à moyen terme à 37 °C et 39 °C en présence d'EPO.

Finalement, la troisième étape consistait d'étudier l'effet de l'hyperthermie légère sur l'expression des protéines de choc thermique ainsi que sur l'activité du facteur de transcription GATA-1. Le système expérimental développé à l'étape 1 a été utilisé en partie pour ce travail.

3.2.1. Modulation des voies JAK/STAT, PI3K/AKT et ERK1/2 à 39 °C

Tel que décrit ci-dessus les deux protocoles ont été utilisés pour effectuer l'analyse de l'état d'activation (phosphorylation) des molécules de signalisation. D'après ce qui peut être observé sur la Fig.3.6A, il y avait une augmentation de 33.5 % de l'intensité de fluorescence de STAT5a/b (pY694) pour les cultures maintenues toute la nuit à 39 °C (Mean Fluorescence Intensity (MFI) 67.6 ± 7.0) comparativement aux cellules maintenues à 37 °C (MFI 44.9 ± 2.0). Ainsi, la phosphorylation de STAT5a/b semblait augmenter pour les cultures maintenues 39 °C

A partir des cellules de la Fig.3.6B, le même type d'analyse de signalisation a été effectué, mais cette fois-ci en faisant une culture des cellules CD34⁺ sans d'EPO et incubées à 37 °C et 39 °C pendant une heure. Un accroissement de 26 % l'intensité de fluorescence de STAT5a/b(pY694) a été observé pour les cultures maintenues à 39 °C soit (MFI 15.8) comparativement aux cellules maintenues à 37 °C soit (MFI 11.6). Ceci

suggère que quelque soit le temps d'incubation des cellules à 39 °C pour toute la nuit ou 1 h à 39 °C, il était possible d'observer une plus grande intensité de fluorescence de phospho-STAT5a/b, suggérant une augmentation d'activité de cette protéine. De ce fait, nous pourrions supposer que l'incubation des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée érythrocytaire à 39 °C permet l'activation de STAT5a/b.

À partir des cellules utilisées précédemment, une augmentation 21 % de l'intensité de fluorescence d'AKT (pS473) a été observée pour les cultures maintenues à 39 °C à court terme (maximal à 15 minutes), une MFI de 17.5 ± 1.5 comparativement à MFI 14.5 ± 0.3 pour les cellules maintenues à 37°C (Fig.3.6C).

Finalement, une culture de cellules CD34⁺ sans d'EPO et incubée à 37 °C et 39 °C à court terme (maximal à une heure), une augmentation 45 % de l'intensité de fluorescence de ERK1/2 (pT202) était également observée pour les cultures maintenues à 39 °C (MFI 15.3 ± 1.9) comparativement à celles maintenues à 37 °C (MFI 8.4 ± 0.2). (Fig.3.7D).

Ces différents résultats montrent une augmentation de l'intensité du signal des protéines étudiées, suggérant de ce fait, un accroissement d'activité de STAT5a/b, AKT et ERK1/2. Ainsi, l'activation de ces protéines peut-être favorisée par l'hyperthermie légère en absence d'EPO. L'analyse de la phosphorylation des autres protéines (STAT1 (pY701), STAT3 (pY705), NF-kBp65 (pS529), PKA-RII α (pS473), P38 (pT180/pY182 et PLC γ 2(pY759) de signalisation mentionnées n'a pas donné de résultats reproductibles (résultats non montrés).

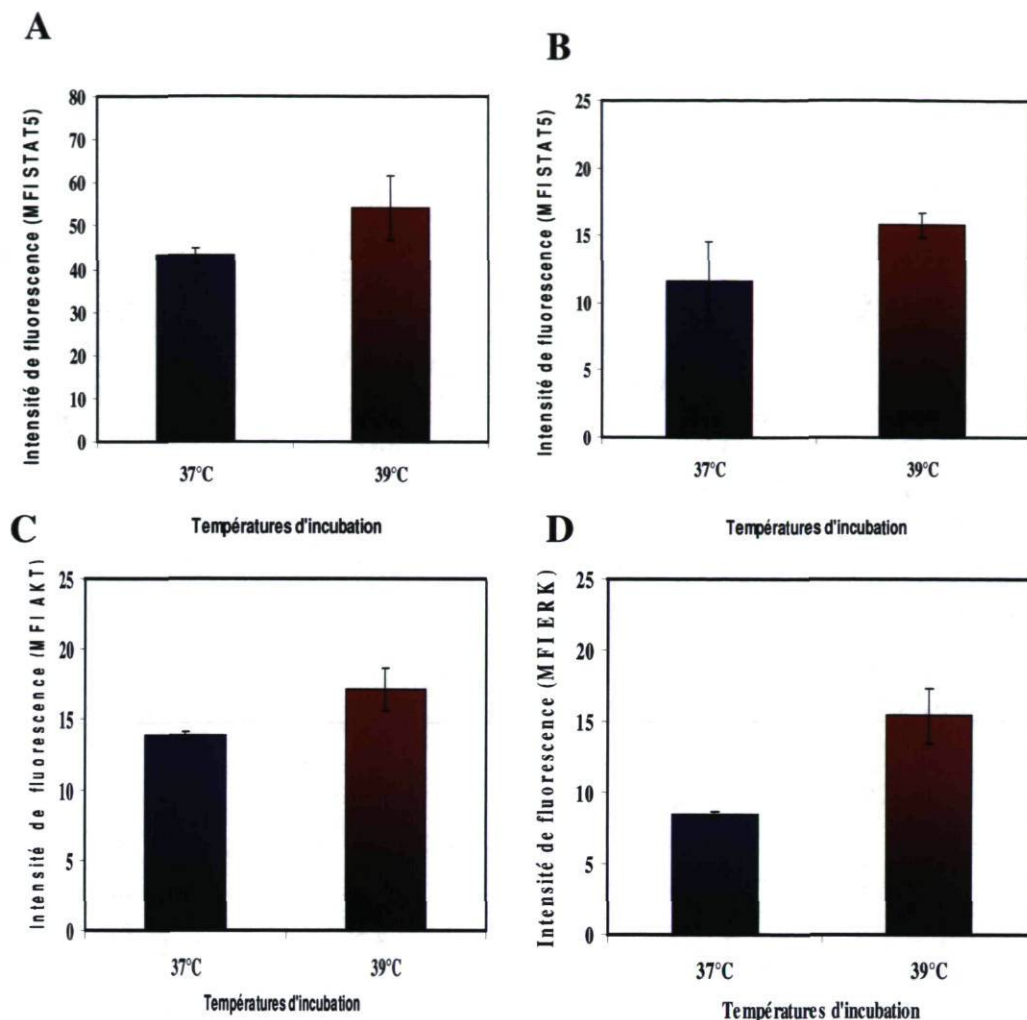


Figure 3.6: Impact à 39 °C sur la phosphorylation de STAT5a/b, AKT et ERK1/2

Analyse par cytométrie intracellulaire des niveaux phosphorylés des protéines STAT5a/b, AKT et ERK1/2. **A** : Intensité de fluorescence de STAT5a/b (pY694) en fonction de la température pour la culture en présence Epo toute la nuit à 37 °C et 39°C **B** : Intensité de fluorescence de STAT5a/b (pY694) en fonction de la température pour les cultures sans EPO incubées 1 h à 37 °C et 39 °C **C** : Intensité de fluorescence d'AKT (pS473) en fonction de la température pour les cultures sans EPO incubées 15 minutes à 37°C et 39 °C **D** : Intensité de fluorescence de ERK1/2 (pT202) en fonction de la température pour les cultures sans EPO incubées 1 h à 37 °C et 39 °C MOY ± ETM. Données de trois expériences indépendantes.

3.2.2. Impact des inhibiteurs JAK/STAT, PI3K/AKT et MEK/ERK1/2

Après avoir montré que l'activation de STAT5a/b, AKT et ERK1/2 semblaient être modulées par l'hyperthermie légère, l'étape suivante était de vérifier si l'activation de ces voies était nécessaire et suffisante pour avoir l'effet de l'hyperthermie légère sur la différenciation des cellules érythroïdes.

Dans le but de réaliser cette étape, nous avons utilisé des inhibiteurs contre ces voies en proposant le modèle présenté à la Fig.1.13. Les inhibiteurs utilisés étaient : JAK Inhibitor I (JAK), Ly294002 (PI3K) et PD98059 (MEK). Ces inhibiteurs qui agissent sur les protéines à l'aval du signal devraient donc annuler l'activation des protéines STAT5a/b, AKT et ERK1/2, respectivement.

En premier lieu, nous avons développé deux protocoles qui se rapprochent des précédents afin de vérifier l'effet de l'hyperthermie légère à court et moyen terme. Les cellules CD34⁺ ont été placées en culture pendant 4 jours à 37 °C et une analyse par cytométrie a été effectuée pour vérifier la proportion de cellules GPA⁺ (Fig.3.7B) (protocole I à court terme). Le but était d'avoir la même population de cellules avant l'ajout des inhibiteurs. Pour le protocole III (constitutif et moyen terme à 39°C), les cellules CD34⁺ ont été placées en culture au jour 0 à 37 °C et 39 °C pendant 2 jours, puis une analyse par cytométrie a été effectuée pour vérifier la proportion de cellules GPA⁺ avant l'ajout des inhibiteurs (Fig.3.7C-D). Après 4 jours de culture des cellules CD34⁺ à 37 °C et avant l'ajout de l'inhibiteur, 14 % des cellules étaient GPA⁺ (Fig.3.7B,).

Avec le protocole III, la proportion de cellules GPA⁺ à 39 °C était supérieure qu'à 37 °C (8.5 vs 6.1 %) (Fig. Fig.3.7C-D). Les inhibiteurs ont donc été ajoutés aux cellules soit aux jours 4 ou 2 pour les protocoles I et III, puis incubées à 37 °C et 39 °C pendant 2 jours. Ensuite, la proportion de cellules GPA⁺ a été mesurée par cytométrie pour les cellules en présence de l'inhibiteur ou le contrôle DMSO (car les inhibiteurs étaient dissous dans le DMSO). Une dose optimale de 20 µM (préalablement définie avec les cellules UT-7/EPO) a été utilisée pour chacun des inhibiteurs (voir section 2.3.1).

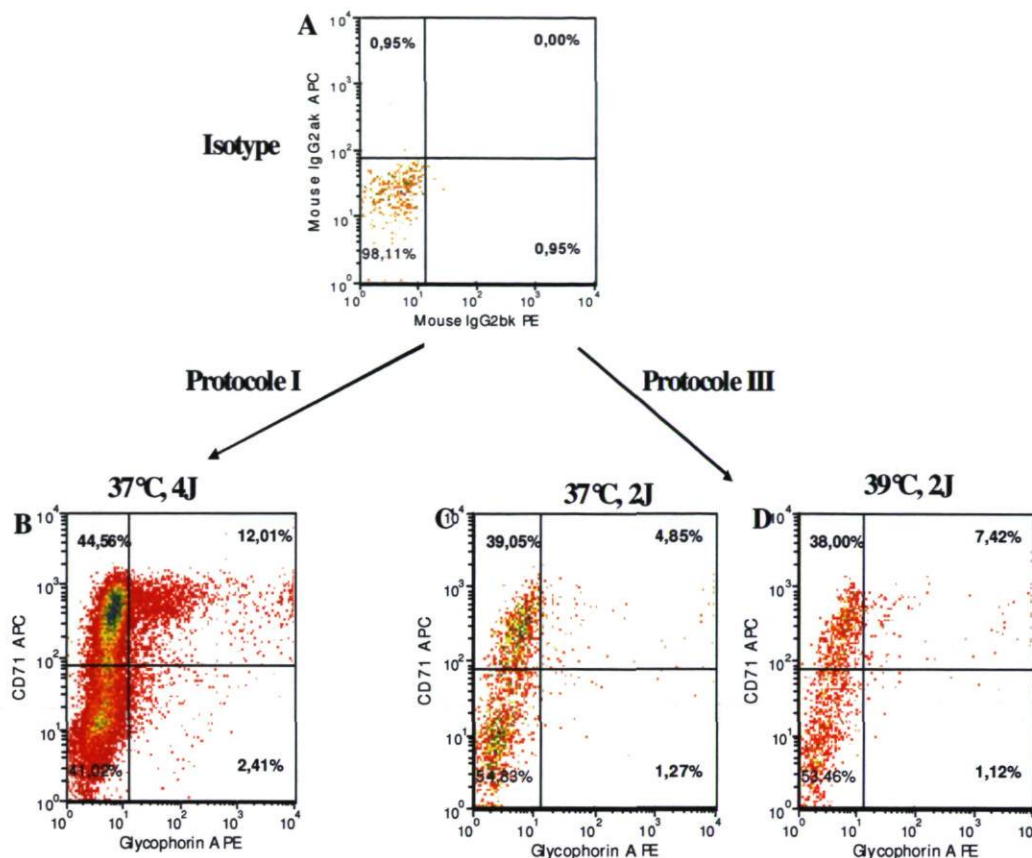


Figure 3.7: Protocoles de culture I et III pour les tests d'inhibiteurs

Protocole I : Les cellules CD34⁺ étaient placées en culture pendant 4 jours à 37 °C dans un milieu favorisant la différenciation des cellules érythrocytaires, puis au jour 4 une analyse par cytométrie a été effectuée pour vérifier l'apparition de la GPA. Protocole III : Les cellules CD34⁺ étaient placées en culture à 37 °C et 39 °C pour deux jours, ensuite une analyse par cytométrie a été effectuée pour vérifier l'apparition de la GPA. **A** : Contrôle isotypique. **B** : Apparition du phénotype GPA pour les cultures maintenues à 37 °C au jour 4. **C** : Apparition du phénotype GPA au jour 2 pour les cellules à 37 °C **D** : apparition du phénotype GPA pour les cultures maintenues à 39 °C au jour 2. Données d'une expérience représentative.

En utilisant les protocoles I et III, nous avons pu étudier les effets des inhibiteurs sur la différenciation des cellules érythroïdes. La Fig.3.8A, montre qu'une inhibition de JAK conduit à une perte considérable de l'effet de l'hyperthermie légère sur la différenciation. En effet, 43,0 % ± 4,5 et 47,0 % ± 0,5 des cellules étaient GPA⁺ pour les cultures en

présence des inhibiteurs de JAK et PI3K à 39 °C, comparativement à une proportion 43,8 % \pm 7.0 de cellules GPA⁺ pour le contrôle DMSO à 37°C. Par conséquent, une même proportion de cellules GPA⁺ était atteinte pour les cultures maintenues à 39°C avec les inhibiteurs par rapport au contrôle à 37°C sans inhibiteur avec le protocole I. Ceci suggère que ces voies sont nécessaires à l'effet de l'hyperthermie légère sur la différenciation. Cependant, elles sont également importantes pour les cultures maintenues à 37 °C, puisqu'on observait une légère diminution de la proportion de cellules GPA⁺ à 37 °C en présence des inhibiteurs. Nous avons aussi inhibé la phosphorylation d'ERK1/2 par un inhibiteur de MEK. Les résultats sont semblables à ceux décrits ci-dessous (résultats non montrés), mais ils ont été observés dès 24 heures. Pour cette raison les résultats ne sont pas montrés sur la même figure. Des résultats similaires ont aussi été observés avec le protocole III; on observait une proportion de 20.0 % \pm 0.7 et 8.6 % \pm 0.5 de cellule GPA⁺ pour les cultures en présence des inhibiteurs de JAK et PI3K à 39 °C et 20.0 % \pm 0.4 de cellules GPA⁺ pour le contrôle DMSO à 37°C. Encore, pour les cultures maintenues à 39 °C (avec inhibiteur) on pouvait atteindre la même ou une plus faible proportion de cellules à GPA⁺ semblable aux cultures à 37 °C sans inhibiteur. Par ailleurs, il faut noter qu'avec le protocole III, l'inhibition était commencée en ayant une plus grande proportion de cellules GPA⁺ à 39 °C par rapport à 37 °C (Fig. 3.8C-D). Et, les résultats démontrent clairement une perte de l'effet de l'hyperthermie légère sur la différenciation, puisqu'on avait souvent la même proportion de cellules GPA⁺ à 39 °C et 37 °C contrôle.

En conclusion, ces résultats intéressants suggèrent donc que, ces voies pourraient être en partie responsables de l'effet de l'hyperthermie légère sur la différenciation des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée érythrocytaire. Le tableau 3.1, résume la perte nette de l'effet de l'hyperthermie légère sur la différenciation des cellules érythroïdes suite à l'utilisation des différents inhibiteurs. En présence de l'inhibiteur de JAK2 et PI3K, une perte de 42.0 et 49.0 % de l'effet de l'hyperthermie légère a été observée à 39 °C avec le Protocole I. Puis, en présence de l'inhibiteur de JAK2 et PI3K, et MEK une perte de 83, 6 et 21.0 % de l'effet de l'hyperthermie légère a été observée à 39 °C avec le Protocole III.

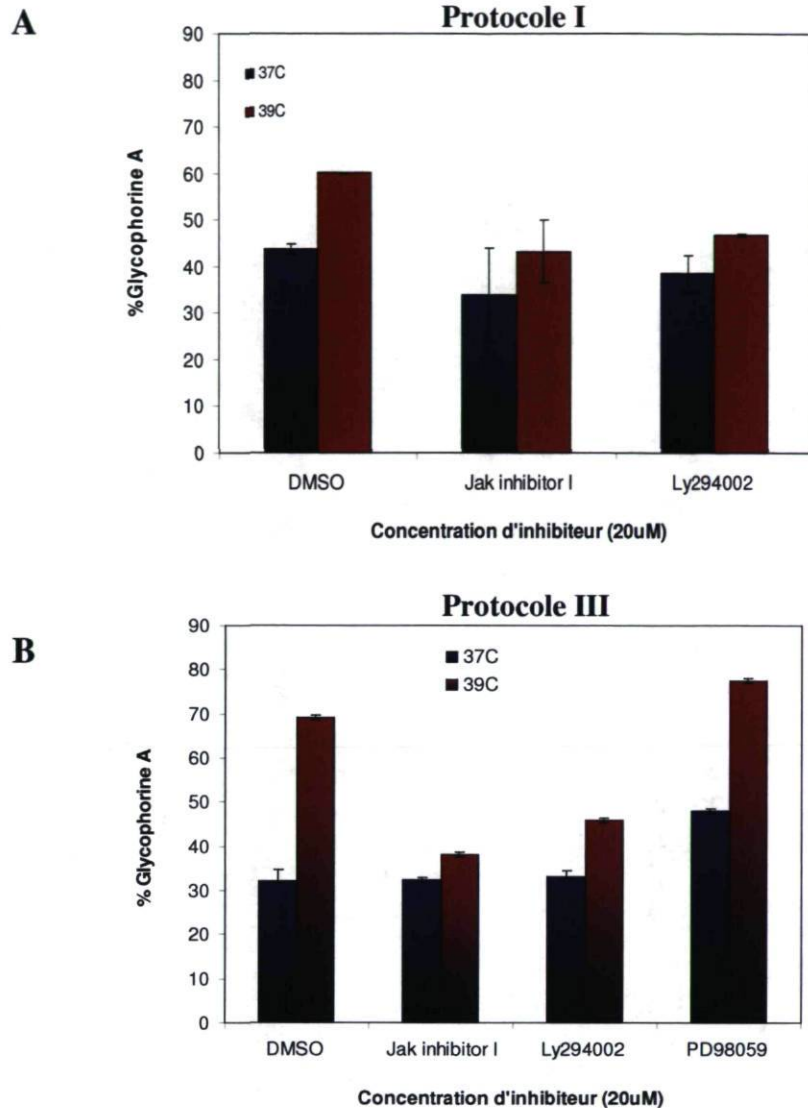


Figure 3.8: Impact à 39 °C sur l'expression de la GPA, après inhibition des voies JAK/STAT, PI3K/AKT et MEK/ERK1/2

Protocole I : les cellules CD34⁺ étaient placées en culture pendant 4 jours à 37 °C dans un milieu favorisant vers la différenciation des cellules érythroïdes (EPO 2U + SFC 20ng/mL), à ce jour, ajout des inhibiteurs aux cellules, et incubées des cellules 37 °C et 39 °C pendant 2 jours. Protocole III : les cellules CD34⁺ étaient placées en culture à 37 °C et 39 °C pour deux jours, à ce jour, ajout des inhibiteurs aux cellules et incubées à 37 °C et 39 °C pour 2 jours A : analyse de la proportion de cellules GPA⁺ au jour 6 pour les cultures maintenues à 37°C et 39 °C (protocole I). B : analyse de la proportion de cellules GPA⁺ pour les cultures maintenues à 37 °C et 39 °C (protocole III). MOY ± ETM de 2 expériences indépendantes présentées.

Tableau 3.1 : Perte de l'effet de l'hyperthermie légère ^A en présence des différents inhibiteurs (MOY \pm ET, n=2)

	JAK	Ly294002	PD98059 ^B
Protocole I	42 % \pm 8 ^A	49 % \pm 2	49 % \pm 10
Protocole III	83 % \pm 2	65 % \pm 1.5	21 % \pm 5

^AVoir section 2.9 pour le détail des calculs

^BAnalyse effectuée après 24 h d'inhibition

3.2.3. Impact à 39 °C sur le niveau d'expression des HSPs

À partir des expériences précédentes, nous avons identifié les protéines STAT5a/b, AKT, et ERK1/2 comme étant modulées suite à un traitement de l'hyperthermie légère. La dernière étape était de déterminer si l'effet de l'hyperthermie légère avait aussi un impact sur l'expression des HSPs, ainsi que sur GATA-1. En tenant compte des travaux de Ribeil et coll. [123], dont les résultats montrent que HSP70 est exprimée constitutivement par les cellules érythroïdes en différenciation et que ce dernier protège GATA-1 contre le clivage par la caspase-3. Nous pensons que le niveau d'expression des HSPs pourrait être élevé pour les cultures maintenues à 39 °C, ce qui pourrait avoir un effet positif sur la régulation de GATA-1 et le tout pourrait permettre d'accélérer la différenciation des cellules érythroïdes à 39 °C. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons proposé le modèle présenté sur la Fig.1.11.

Afin de vérifier si l'hyperthermie légère passait directement par les HSPs, nous avons effectué des analyses par immunobuvardage pour vérifier le niveau d'expression des HSPs (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90). Pour ce faire, les cellules ont en premier lieu été incubées à 37°C, pendant 4 jours, puis incubées à 37 °C -39 °C pour toute une nuit. Ou en deuxième lieu, les cellules ont été incubées constitutivement à 39 °C ou 37 °C jusqu'au

jour 5. Une analyse de l'expression de GPA par cytométrie a permis de confirmer que l'hyperthermie légère avait bien eu ses effets dans les deux protocoles d'incubation.

L'analyse des HSPs par immunobuvardage montre une légère augmentation de HSP27 (2X) avec 2 µg de protéines pour les cultures maintenues à 39°C pour toute la nuit, comparativement au contrôle à 37 °C. La bande de 2 µg de protéine à 39 °C est semblable à celle observée avec 4 µg à 37 °C. Par contre, l'expression de HSP27 est diminuée avec 2 µg de protéines pour les cultures maintenues de façon constitutive à 39 °C, mais plus élevé à 37 °C Ceci suggère que l'augmentation de l'expression de HSP27 se fait probablement de façon transitoire dans les cellules CD34⁺ vers la lignée des cellules érythroïdes en condition d'hyperthermie légère. En raison de la saturation des films, pas de différences significatives ont été observées entre les cultures avec 4 et 6 µg (Fig.3.11). Une légère augmentation de HSP60 (2X) a aussi été observée (comparer les puits avec 2 µg de protéine, Fig.3.9) pour les cellules incubées à 39 °C pour toute une nuit ou constitutivement.

Quant à HSP70, le niveau d'expression était fortement augmenté pour toutes les cultures maintenues à 39 °C comparativement à 37 °C. L'intensité de la bande de 2 µg à 39°C est semblable à celle de la bande de 6 µg de protéine à 37 °C Suggérant qu'il y avait une augmentation de 3 fois le niveau d'expression de HSP70 à 39 °C comparativement à 37 °C (Fig.3.9). L'analyse du niveau l'expression de HSP90, ne montre pas de différence significativement pour les cultures maintenues à 37°C et 39 °C, et ce, pour les cultures incubées toute la nuit ou constitutives. HSP90 ne semble pas être modulé par l'hyperthermie légère (Fig.3.9).

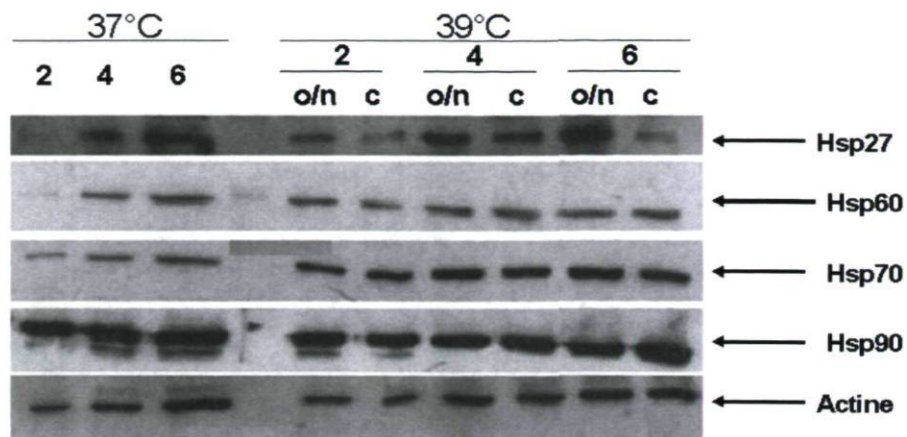


Figure 3.9: Impact de l'hyperthermie légère sur le niveau d'expression des HSPs.

1- Les cellules CD34⁺ ont été cultivées dans un milieu favorisant la différenciation vers la lignée érythrocytaire à 37 °C pendant 4 jours. À ce jour, les cellules ont été incubées 37 °C et 39 °C pour toute la nuit (o/n). 2- Les cellules CD34⁺ ont été cultivées en condition favorisant la lignée érythrocytaire et incubées pendant 5 jours à 39 °C (constitutive (c)). **Puits 1** : 2 µg de protéine culture au jour 5 à 37 °C, **Puits 2** : 4 µg de protéine culture au jour 5 à 37 °C **Puits 3** : 6 µg de protéine culture au jour 5 à 37 °C **Puits 4** : 2 µg de protéine culture au jour 5 à 39 °C (o/n), **Puits 5** : 2 µg de protéine culture au jour 5 à 39 °C (c). **Puits 6** : 4 µg de protéine culture au jour 5 à 39 °C (o/n). **Puits 7** : 4 µg de protéine culture au jour 5 à 39 °C (c). **Puits 8** : 6 µg de protéine culture au jour 5 à 39 °C (o/n). **Puits 9** : 6 µg de protéine culture au jour 5 à 39 °C (c). Expériences représentatives montrées (n =1 et n >2 pour certaines protéines).

3.2.4. Impact à 39 °C sur le niveau l'expression de GATA-1

Étant donné que le facteur de transcription GATA-1 est essentiel pour la différenciation des cellules érythroïdes. Nous avons vérifié son expression ainsi que son niveau de phosphorylation (GATA-1(pS310)) par immunobuvardage, en effectuant une cinétique à 39 °C. Pour ce faire, les cellules CD34⁺ ont été mises en expansion pendant 4 jours à 37 °C. Au jour 4, les cellules ont été incubées à 39 °C, pendant 2 h, toute une nuit, et 48h. Selon ce qui peut être observé sur la Fig.3.10, il n'y a pas de différence significative pour la forme phosphorylée de GATA-1(pS310), ainsi que des niveaux totaux pour les cultures maintenues à 37 °C et 39 °C.

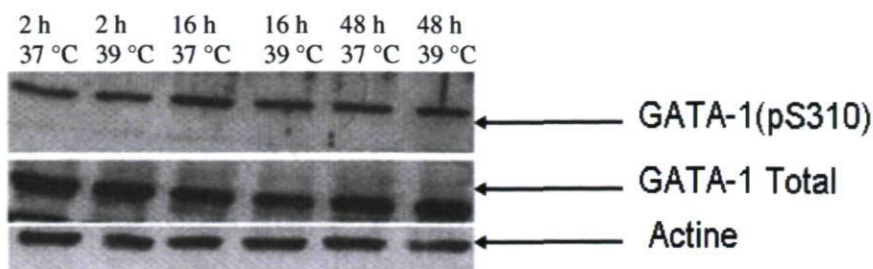


Figure 3.10 : Impact à 39 °C sur le niveau d'expression de GATA-1 (pS310).

Les cellules CD34⁺ ont été cultivées dans un milieu favorisant la différenciation vers la lignée érythrocytaire et incubées à 37 °C pendant 4 jours. À ce jour, les cellules ont été incubées 37 °C et 39 °C pendant 2h, toute la nuit et 48 h. Puits 1 à 6 de gauche vers la droite : **Puits 1** : 2.5 µg de protéine culture au jour 4 à 37 °C (2 h), **Puits 2** : 2.5 µg de protéine culture au jour 4 à 39°C (2h). **Puits 3** : 2.5 µg de protéine culture au jour 5 à 37 °C (toute la nuit, 16h). **Puits 4** : 2.5 µg de protéine culture au jour 5 à 39 °C (toute la nuit, 16 h), **Puits 5** : 2.5 µg de protéine culture au jour 6 à 37 °C (48 h). **Puits 6** : 2.5 µg de protéine culture au jour 6 à 39 °C (48h). Une expérience représentative montrée, n≥2.

3.2.5. Impact a 39 °C sur l'activité transcriptionnelle de GATA-1

N'ayant pas observé de différence significative dans les niveaux de GATA-1 totaux et de GATA-1(pS310) entre les cultures maintenues à 37 °C et 39 °C, nous avons décidé d'effectuer des études plus approfondies, en utilisant une technique plus sensible que l'immunobuvardage qui pouvait nous permettre de suivre l'activité transcriptionnelle de GATA-1. Tel que décrit dans la section 1.3.2, le facteur de transcription GATA-1 et le co-facteur FOG-1 sont essentiels pour la différenciation des cellules érythroïdes. Pour les cellules érythroïdes ou cellules MKs, l'activité transcriptionnelle de GATA-1 est requise pour activer le promoteur α IIb [137]. En tenant compte de cela, nous avons utilisé un plasmide contenant un promoteur α IIb présent à l'aval du gène de la luciférase. L'ADN plasmidique a été transfecté par électroporation dans les cellules UT-7/EPO. Après transfection, une cinétique a été effectuée, en incubant les cellules à 39 °C pendant 1 h, 4 h, 6 h et 48 h. Sur la Fig.3.11, on remarque que l'activité transcriptionnelle de GATA-1 était augmentée après 4 h d'incubation des cellules UT-7/EPO à 39 °C, comparativement à celle maintenues à 37 °C. Par contre, l'activation de GATA-1 semble être transitoire,

car après 4 h d'incubation des cellules à 39 °C, une diminution de l'intensité de la fluorescence émit par la luciférase était observée. Ces résultats permettaient d'expliquer le phénomène observé par le test de l'expression de GATA-1 (pS310) par immunobuvardage. En effet, on ne remarquait pas de différence significative du niveau d'expression de GATA-1 (pS310) entre les cultures maintenues à 37 °C et 39 °C, car le test a été fait après 2, 16 et 48h d'incubation des cellules à 39 °C.

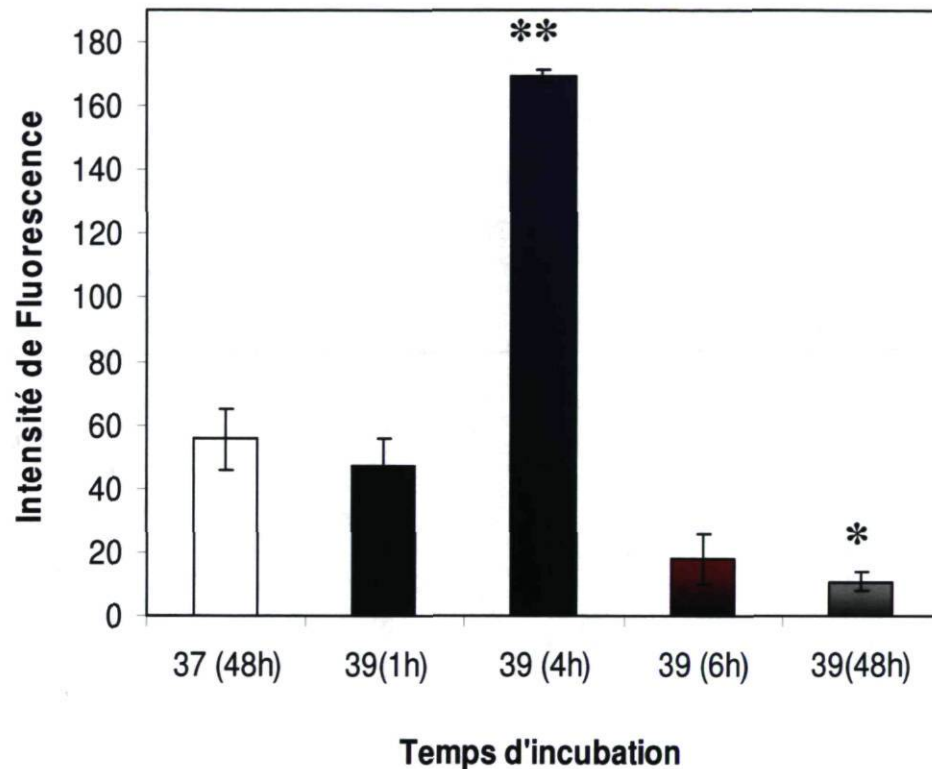


Figure 3.11 : Impact à 39 °C sur l'activité transcriptionnelle de GATA-1.

Les cellules UT7/Epo ont été électroporées avec les plasmides pGL3 (pGL3 ou PGL3- α IIb) puis incubées à 37 °C ou 39 °C pendant 48 h. Après 48 heures, une cinétique a été effectuée avec les cellules maintenues à 37 °C, soit une incubation de 1 h, 4 h et 6 h à 39 °C. Le test de la luciférase a été effectué avec les différents extraits cellulaires en ajoutant son substrat et l'analyse a été faite par le luminomètre une minute. Une intensité de fluorescence plus forte démontre une plus grande activité transcriptionnelle de GATA-1. Données de 3 expériences représentatives indépendantes (MOY \pm ETM). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ par rapport au contrôle à 37 °C (48 h).

3.3. Impact à 39 °C sur la granulopoïèse

Nous avons aussi vérifié l'effet de l'hyperthermie légère sur l'expansion des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée granulocytaire. Une augmentation de l'expansion des cellules maintenues à 39 °C a été observée par rapport au contrôle à 37 °C (Fig. 3.12). Cette différence était très significative ($p < 0.01$) surtout au jour 7 de culture où une hausse d'expansion de 2.6 fois à 39 °C est remarquée par rapport au contrôle à 37°C. Cependant, après 7 jours de culture, il n'y avait pas de différence significative d'expansion entre les cultures maintenues à 37 °C et 39 °C. Ces résultats suggèrent que l'effet de l'hyperthermie légère sur l'expansion des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée granulocytaire s'effectue probablement au début de culture. Ceci va dans le même sens que les résultats de l'effet de l'hyperthermie légère sur l'expansion des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée érythrocytaire. En effet, une augmentation de l'expansion de façon significative était remarquée aux jours 5 et 7 pour les cellules maintenues à 39°C par rapport au contrôle à 37 °C. Comme en condition favorisant la différenciation vers la lignée érythrocytaire, l'hyperthermie légère n'avait pas d'effet significatif sur la viabilité cellulaire des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation vers la lignée granulocytaire (résultats non montrés). Le compte des cellules au bleu de trypan montrait une viabilité de ~85 %.

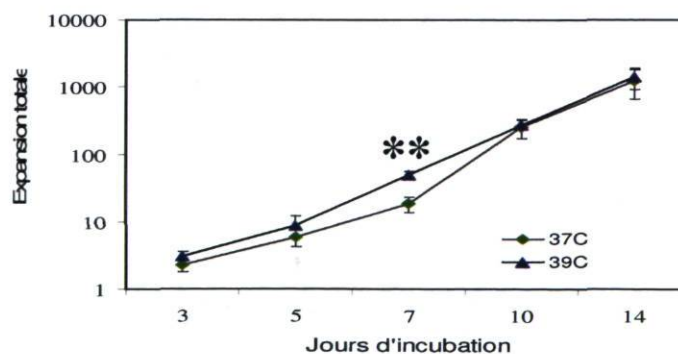


Figure 3.12: Impact à 39 °C sur l'expansion des cellules de la lignée granulocytaire

Expansion totale sur une période de 14 jours (** $p < 0.01$ $n=3$). Données de 3 expériences représentatives indépendantes. MOY ± ETM.

3.3.1. Impact à 39 °C sur la maturation des cellules granulocytaires

Nous avons remarqué une augmentation de l'expansion des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée granulocytaire à 39°C. En conséquence, nous avons voulu vérifier s'il y avait aussi une accélération de la maturation des cellules maintenues à 39 °C.

Dans le but de vérifier cette hypothèse, des analyses morphologiques ont été effectuées pour évaluer les différentes étapes de différenciation des cellules de la lignée granulocytaire. En général, la maturation des cellules granulocytes à 39 °C était plus avancée à 39 °C qu'à 37 °C. Dès le jour 5 de culture, il y avait apparition de quelques cellules granulocytes mature (2 %) à 39 °C (Fig.3.13A), alors qu'aucune n'était encore rendue à cette étape de maturation pour les cultures maintenues à 37 °C (Fig.3.13B). Un autre fait intéressant est qu'à 37 °C, la majorité des cellules était des granulocytes immatures (cellules myéloblastes) au jour 5, alors que la majorité des cellules au même jour à 39 °C étaient rendues à l'étape plus avancée (métamyéloblastes, Fig.3.13A-B). Similairement, au jour 10 une proportion de 41,4 % ± 0.7 de cellules étaient des granulocytes matures à 39 °C comparativement à seulement 7.5 % ± 2.0 à 37°C. Ces résultats sous-entendent que l'effet de l'hyperthermie légère accélère la maturation des granulocytes issus de la différenciation des cellules CD34⁺ en condition d'hyperthermie légère. Les photos de cellule granulocyte après coloration au GIEMSA confirmaient également qu'au jour 10 de culture, qu'il y avait une très grande proportion de cellules granulocytes matures à 39 °C par rapport aux cellules maintenues à 37 °C (Fig.3.13C).

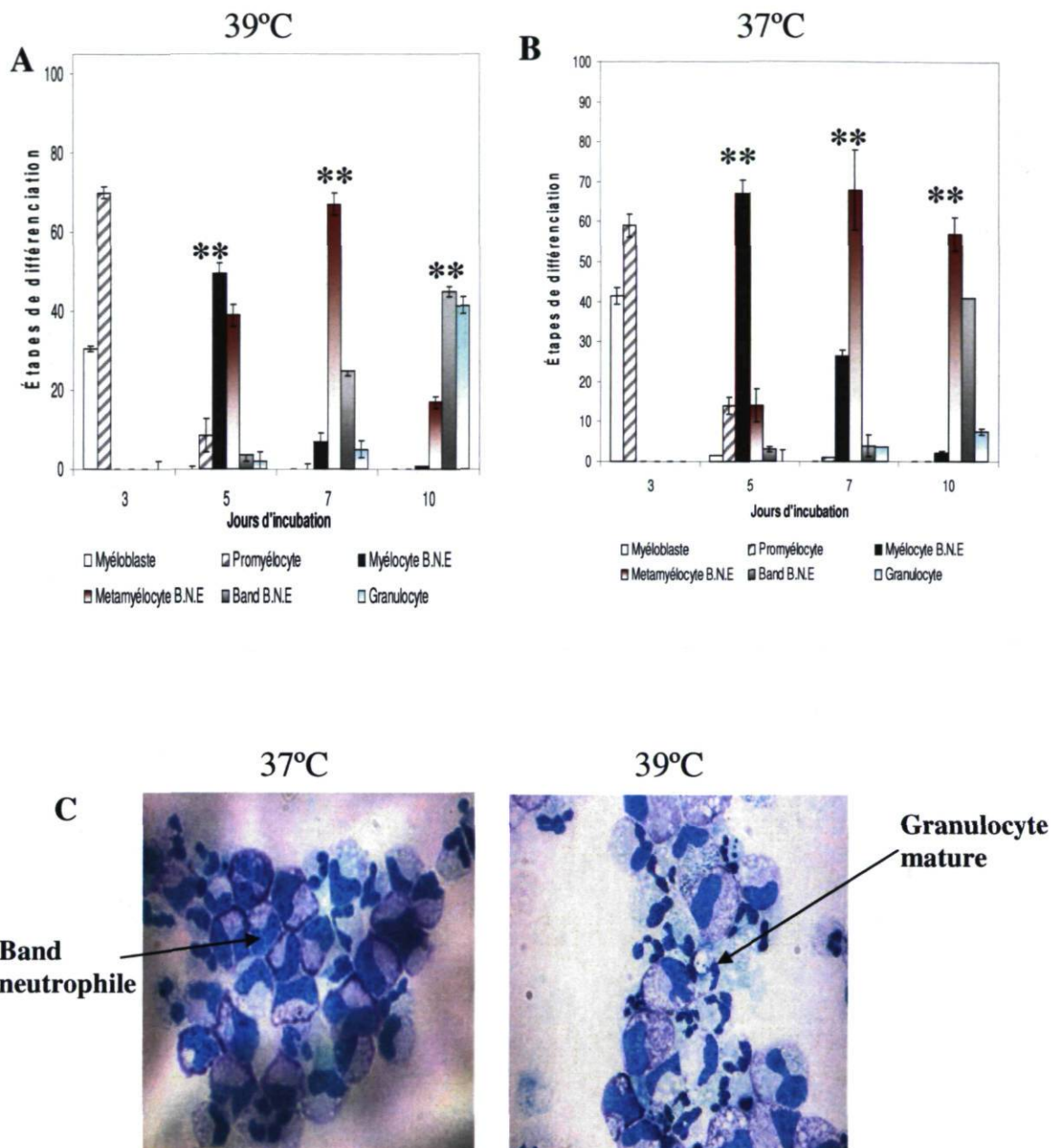


Figure 3.13: Impact à 39 °C sur la maturation des cellules granulocytaires

A : photo de cellules granulocytes colorées au GIEMSA au jour 14. **B** : Étapes de maturation des cellules granulocytes en fonction du temps à 37 °C (** $p < 0.01$ $n=3$). **C** : Étapes de maturation des cellules granulocytes en fonction du temps à 39 °C (** $p < 0.01$ * $p < 0.05$, $n=3$) MOY \pm ETM. Données de 3 expériences indépendantes.

3.4. Impact à 39°C sur la monocytose

Selon les résultats de l'effet de l'incubation à 39 °C sur l'expansion des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée érythrocytaire et granulocyte, nous avons aussi vérifié l'effet de l'incubation à 39 °C sur l'expansion des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée monocyttaire. On remarque sur la Fig.3.14, une légère augmentation de l'expansion des cellules maintenues à 39°C, par rapport au contrôle à 37°C en début de culture. En revanche, après 5 jours de culture on observe une diminution drastique (2.5 fois, $p < 0.05$) de l'expansion pour les cultures maintenues 39°C par rapport au contrôle à 37 °C. Fait important à noter, une diminution importante de la viabilité des cellules 39 °C fut observée à partir du jour 10 de culture ($72.0 \pm 10.0 \%$ vs $95.0 \pm 0.5 \%$ à 39 °C et 37 °C respectivement, $n=2$). Au jour 14, la viabilité à 39 °C était réduite en moyenne de 11.0 %. Ces résultats vont à l'encontre en partie de ceux observés avec les cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée érythrocytaire et granulocytaire. Ce qui sous-entend que les cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation vers la lignée monocyttaire sont plus sensibles en condition à 39 °C.

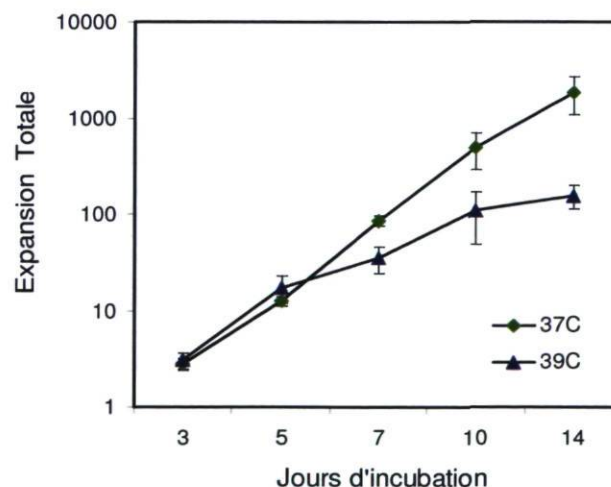


Figure 3.14: Impact à 39 °C sur l'expansion des cellules de la lignée monocyttaire

Les cellules CD34⁺ ont été cultivées dans un milieu favorisant la différenciation vers la lignée monocyttaire et incubées à 37 °C et 39 °C Expansion totale sur une période de 14 jours (** $p < 0.01$ $n=3$) MOY \pm ETM de 3 expériences représentatives indépendantes.

3.4.1. Impact à 39 °C sur la maturation des cellules monocytaires

Nous avons également évalué l'effet de l'hyperthermie légère sur la maturation des cellules monocytes afin de vérifier si la diminution d'expansion à 39 °C était due en partie à une maturation plus rapide de ses cellules. Des analyses de morphologie ont été effectuées pour évaluer les différentes étapes de différenciation de la lignée monocyttaire. Dès le jour 3 de culture, il y avait apparition de quelques cellules monocytes matures (8 %) à 39 °C, alors que la majorité des cellules à 37 °C étaient aux stades monoblastes ou monocytes immatures (Fig.3.15A). Après 7 jours de culture des cellules à 39 °C, il y avait environ 55 % des cellules qui étaient des monocytes matures à 39 °C, comparativement à seulement 20 % de cellules monocytes à 37 °C (le reste étant des monocytes moyennement matures). De façon générale, la maturation des cellules monocytes semblait s'effectuer de façon très rapide, comparativement aux autres lignées testées. En effet, pour les cultures maintenues à 37 °C et 39 °C, dès le jour 3, il y avait apparition de quelques monocytes matures. À la fin de culture (jour 14), plus 90 % des cellules étaient des monocytes matures à 39 °C comparativement à 70 % à 37 °C (Fig.3.15B). En résumé, ces résultats démontrent que l'hyperthermie légère accélère la maturation des monocytes, mais à un impact négatif sur leur expansion, peut être en raison de l'accélération précoce de la maturation ou encore dû à la baisse de la viabilité des cellules en condition d'hyperthermie légère.

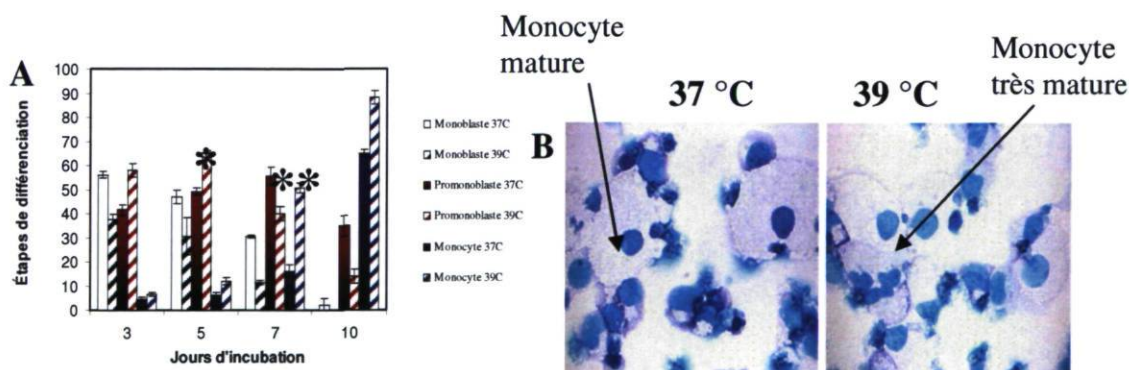


Figure 3.15: Impact à 39 °C sur la maturation des cellules de la lignée monocyttaire

A : Photo de cellule monocyte au jour 14 maintenues à 37 °C et 39 °C **B** : Étapes de la différenciation des cellules monocytes en fonction du temps d'incubation. Données de 2 expériences indépendantes représentées. MOY ± ETM.

3.5. Impact à 39 °C sur l'expansion des progéniteurs myéloïdes

À partir des résultats obtenus de l'effet de l'hyperthermie légère sur la prolifération des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée érythrocytaire, granulocyte et monocyte, ainsi que les résultats des travaux antérieurs avec les cellules MKs, nous nous sommes demandés si les effets observés étaient en partie dus à une augmentation de l'expansion des progéniteurs myéloïdes en condition d'hyperthermie légère. Pour vérifier cela, nous avons effectué des essais de progéniteurs. À partir de la Fig.3.16A, en début de culture, nous avons observé un accroissement d'expansion de progéniteurs à 39 °C, soit 1.9 - et 1.5-fois aux jours 4 et 7 respectivement comparativement à 37°C. Au-delà de 7 jours, le nombre des progéniteurs augmentait à 37 °C comparativement à 39°C. Cet effet observé était normal, parce que si la température accélère la différenciation des cellules, on pourrait s'attendre d'observer moins de progéniteurs à plus long terme dans les cultures à 39 °C.

L'analyse de la Fig.3.16B montre qu'au début (jour 4) de culture l'hyperthermie légère favorisait une augmentation de l'expansion des progéniteurs des cellules érythroïdes (BFU-E/CFU-E). Par contre, à partir du jour 7, une diminution de l'expansion de ces progéniteurs était observée. Cette décroissance à 39 °C pourrait être due à la diminution du nombre de progéniteurs des cellules érythroïdes immatures à 39 °C

Finalement, l'analyse de la Fig.3.16C montre que l'hyperthermie légère permettait une augmentation de l'expansion des progéniteurs GMP aux jours 4 et 7 respectivement. Les progéniteurs GMP semblaient se différencier plus lentement à 39 °C par rapport aux progéniteurs des cellules érythroïdes.

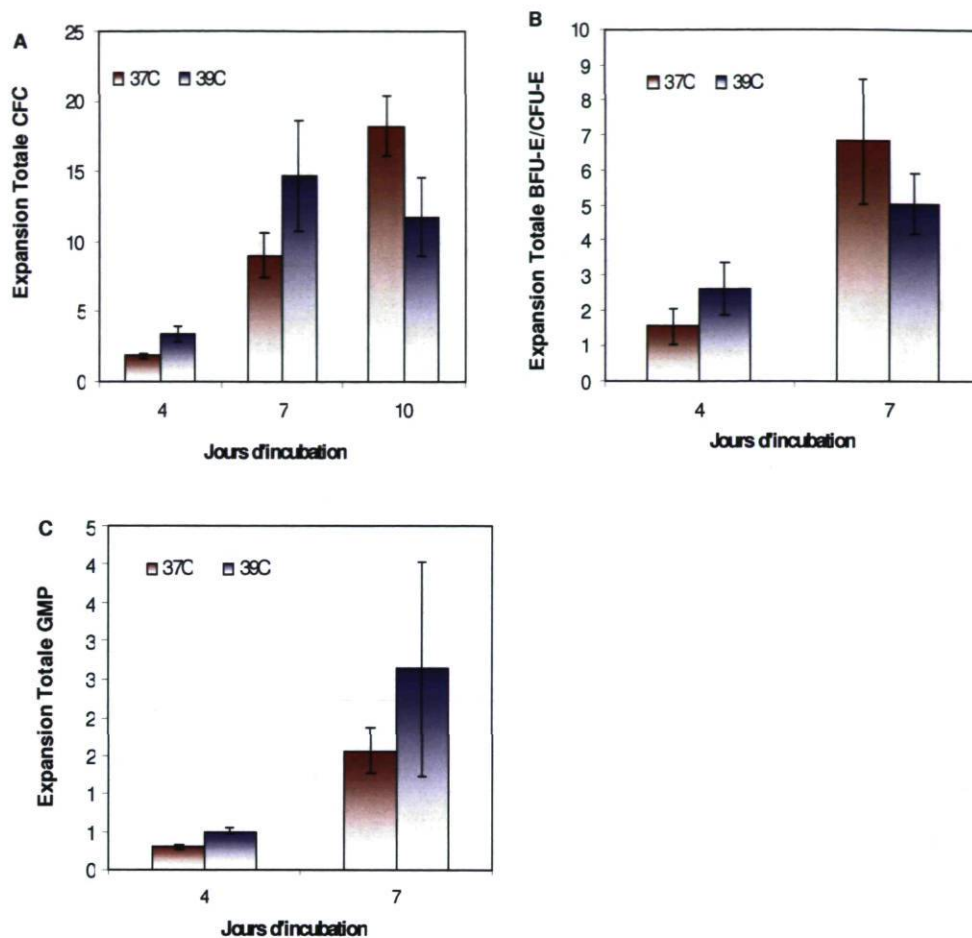


Figure 3.16: Impact à 39 °C sur l'expansion des progéniteurs myéloïdes

A : Expansion totale de CFC totale sur une période de 10 jours. **B** : Expansion totale du progéniteur des cellules érythroïde (BFU-E/CFU-E) sur une période de 7 jours. **C** : Expansion totale du progéniteur granulocyte/monocyte (GMP) sur une période de 7 jours. MOY ± ETM de 2 expériences indépendantes ($p > 0.05$).

4 Discussion

Des travaux antérieurs avaient permis de montrer que l'hyperthermie légère favorisait une augmentation de la prolifération ainsi qu'une accélération de la différenciation des cellules CD34⁺ vers la voie des cellules MKs [115]. Le but de cette étude était donc de déterminer s'il était possible d'observer les mêmes effets en utilisant des cultures favorisant les voies de différenciations des cellules érythrocytaires, granulocytaires et monocytaires. Les résultats du présent projet ont permis de confirmer l'hypothèse générale émise au début des travaux, c'est-à-dire qu'il y avait une plus grande expansion cellulaire à 39 °C pour la majorité des lignées myéloïdes testées, cette expansion était favorisée par une entrée rapide en cycle cellulaire des cellules CD34⁺. Cette étude a abouti à des observations intéressantes et captivantes, dont les résultats ont permis de cerner et d'apporter une meilleure compréhension du phénomène entourant les effets avantageux d'hyperthermie légère sur la différenciation et l'expansion des cellules érythroïdes. Dans cette section, nos discussions porteront sur ces observations ainsi que les mécanismes généraux potentiellement impliqués.

4.1. Impact à 39°C sur l'expansion et la différenciation des diverses lignées de la voie myéloïde

Nous avons utilisé différents cocktails de cytokines prédéfinis pour permettre la différenciation des cellules CD34⁺ vers 3 différentes lignées myéloïdes, soit les lignées des cellules érythroïdes, granulocytes et monocytes. Nos résultats montrent une forte expansion cellulaire à 39 °C des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation vers la lignée érythrocytaire, une légère augmentation de l'expansion à 39 °C des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation vers la lignée granulocytaire, et finalement, nous avons observé une diminution drastique de l'expansion à 39 °C des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée monocyttaire. La diminution de l'expansion des cellules monocytes va à l'encontre de l'effet de l'hyperthermie légère sur l'expansion qui a été observée avec les deux autres lignées myéloïdes étudiées. Cependant, l'ensemble de nos résultats montre que

l'hyperthermie légère favorise l'accélération de la différenciation et de la maturation de toutes les lignées de la voie myéloïde testées, incluant les cellules monocytes.

4.2. Impact à 39 °C sur l'érythropoïèse

Lors de nos analyses, nous avons observé une différenciation plus avancée et un changement morphologique remarquable pour les cultures maintenues à 39 °C. En premier lieu, l'analyse par cytométrie nous a permis de montrer que le marqueur de différenciation des cellules érythroïdes, la GPA, apparaissait plus rapidement sur les cellules incubées à 39 °C par rapport au contrôle à 37 °C. Ce changement phénotypique était très évident dès le début de culture, en effet, après 5 jours de culture, une plus grande proportion des cellules était déjà GPA⁺ à 39 °C comparativement aux cellules maintenues à 37 °C. L'expansion des cellules GPA⁺ était aussi significativement plus élevée pour les cultures maintenues à 39°C.

En outre, l'analyse morphologique réalisée avec coloration au GIEMSA, nous a également permis de mettre en évidence que les cellules maintenues à 39 °C étaient très avancées dans leurs cycles de maturation. Effectivement, après 7 jours de culture à 39°C, 60 % des cellules étaient rendues au stade des cellules érythroblastes polychromatophiles (cellule érythrocyte moyennement mature), alors que la moitié des cellules maintenues à 37°C étaient encore au premier stade de différenciation, c'est-à-dire à l'état des cellules érythroblastes basophiles (cellule érythrocyte immature). Finalement, une des observations les plus intéressantes a été observée à la fin de culture. À cet égard, après 14 jours de culture des cellules à 39°C, nous avons été capable de générer une plus grande proportion de globules rouges énucléés (réticulocyte) à 39 °C qu'à 37 °C (15 % à 39 °C par rapport à 7 % à 37 °C). Ce haut taux d'énucléation était dû en partie à l'enlèvement de SCF à partir du jour 5 de culture, en effet, à ce jour les cellules ont été mises en culture en présence d'EPO pour permettre la maturation. Le fait d'enlever le SCF au début de culture (au jour 5) était fondamental au succès des résultats observés, parce que ce dernier induit un ralentissement de la différenciation des cellules érythroïdes, pour permettre l'expansion des progéniteurs les plus immatures [138].

Cependant, les résultats montrent clairement que l'hyperthermie légère favorise la maturation des globules rouges, parce que sous les mêmes conditions, les cellules

maintenues à 37 °C avaient un plus faible taux d'énucléation. Le mécanisme responsable pour le phénomène d'énucléation et sa possible modulation par l'hyperthermie légère reste encore inconnu, mais il se pourrait bien que cela soit dû à une plus grande activité du facteur de transcription GATA-1 comme nos résultats de luciférase le suggèrent.

En conclusion, nous avons été capables de générer une bonne proportion de globules rouges avec un système de culture relativement simple par rapport aux autres protocoles plus complexes proposés dans la littérature, par exemple le groupe de Giarratana et coll. [93], ont obtenu après 14 jours de coculture de cellules CD34⁺ issues de SC avec des cellules stromales, un taux d'énucléation similaire à celui obtenu dans notre étude, soit $18 \pm 4 \%$. De plus, Dorn et coll. [94], ont également réussi à générer des globules rouges en utilisant une culture en trois phases, à partir des cellules CD34⁺ (mobilisée au G-CSF) du sang périphérique. Au jour 14 de culture, ces auteurs avaient obtenu une proportion $43.1 \pm 18.9 \%$ de cellules érythroblastes polychromatophiles, par contre, le pourcentage des cellules non érythroïdes était très élevé, soit $28 \pm 20.5 \%$. Il faut noter que, contrairement à nos résultats, ces auteurs ont pu générer des globules rouges après 21 jours de culture, soit une proportion de $47.9 \pm 18.9 \%$.

Par ailleurs, dans le but de vérifier si une incubation plus longue des cellules à 37°C pourrait permettre d'atteindre la même proportion de globules rouges qu'à 39°C nous avons effectué un test avec en utilisant des cultures de 21 jours. Pour ce faire, les cellules ont d'abord été pré-incubées à 39 °C pendant 7 jours, ensuite, les cellules ont été transférées à 37 °C jusqu'au jour 21. Mais ce protocole ne nous a pas permis d'observer une plus grande proportion des cellules érythrocytes énuclées pour les cultures transférées à 37 °C. De plus, aucune augmentation de la proportion de globules rouges énuclées n'a été observée dans les cultures maintenues à 39 °C pour 21 jours (résultats non montrés), possiblement dues à une baisse de la viabilité cellulaire à 39 °C après 14 jours de culture.

En résumé, une culture de 14 jours des cellules CD34⁺ à 39 °C pourrait être suffisante pour permettre de générer une grande quantité de globules rouges. En effet, $2.05 \pm 0.59 \times 10^5$ de réticulocytes furent produits par cellulesensemencées à 39 °C, comparativement à seulement $0.79 \pm 0.05 \times 10^5$ à 37 °C (MOY \pm ETM). Néanmoins, il serait intéressant de continuer l'optimisation d'un protocole de culture permettant la production d'une plus

grande quantité de globules rouges ex vivo. Pour finir, il serait aussi essentiel d'analyser la fonctionnalité des globules rouges générés ex vivo à 39 °C. Cela pourrait emmener un nouvel espoir pour la production de globules rouges ex vivo et permettre ainsi de répondre au besoin transfusionnel toujours grandissant.

4.2.1. Impact à 39 °C sur la prolifération et le cycle cellulaire des cellules érythroïdes

Les résultats du présent projet ainsi que ceux obtenus avec les travaux antérieurs [115, 116], montrent tous que l'hyperthermie légère favorise un accroissement de la prolifération des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée érythrocytaire et des cellules MKs. Cependant, ce phénomène demeure encore partiellement inexplicé. Nos résultats montraient une forte diminution hautement significative de la proportion des cellules en quiescence (G0) après 3 jours pour les cultures maintenues à 39°C, suggérant l'entrée plus rapide des cellules CD34⁺ en cycle en condition d'hyperthermie légère.

Il est connu qu'une forte proportion des cellules CD34⁺ issues du SC ombilical sont en G0/G1 et ces dernières, entrent rapidement en cycle une fois placées en culture et stimulées avec des cytokines telles que le SCF, TPO et FL [139-141].

Nos résultats d'analyse du cycle cellulaire s'apparentent fortement aux résultats observés par Koenig et coll. [141], puisqu'au jour 0 avant la mise en culture de cellules CD34⁺ une grande proportion des cellules étaient en phase G0 (soit 85 %) et environ 15 % en phase G1 (cycle actif). Et après 3 jours de cultures des cellules à 39°C, il y avait une diminution de la proportion des cellules en G0 (45 % à 39 °C par rapport à 53 % à 37 °C). Ce résultat suggère une entrée plus rapide des cellules en cycle à 39°C. Il se pourrait aussi que les cellules progressent plus rapidement en cycle cellulaire à 39 °C. À cet égard, nos résultats du jour 3 et 5 indiquent que les proportions de cellules en phase S/G2/M étaient significativement plus élevées en condition d'hyperthermie légère. De plus, des récents résultats obtenus dans notre laboratoire ont indiqué que l'index de prolifération des cellules CD34⁺ (avec coloration au CFSE) était augmenté en moyenne de 1.5 fois à 39°C

durant les trois premiers jours de culture. Ainsi, l'ensemble de ces résultats nous a permis de poser et répondre à la question suivante.

Comment l'hyperthermie légère affecte telle la progression des cellules CD34⁺ en cycle cellulaire ?

Il est possible qu'il y ait une augmentation d'activité des cyclines D1 dans les cellules à 39°C en début de culture. En effet, des études antérieures avaient permis de confirmer que l'hyperthermie légère permettrait d'augmenter l'expression de la cycline D1. [142]. Un traitement de cellules NIH3T3 et des cellules de rat à différentes températures soit (39°C-45 °C pendant 40 minutes), montraient une augmentation de l'expression de la cycline D1. Cependant, nous ne sommes pas encore en mesure de confirmer la possibilité d'un tel phénomène dans le cadre de nos cultures. Néanmoins, cette piste serait assurément intéressante à explorer et à développer afin de comprendre l'impact direct et indirect de l'hyperthermie légère sur le cycle cellulaire et sur l'expansion des cellules hématopoïétiques ex vivo.

4.3. Mécanismes possiblement responsables des effets à 39 °C sur la différenciation des cellules érythroïdes

4.3.1. Impact à 39 °C sur les molécules de signalisation et sur GATA-1

Nos résultats de l'effet de l'hyperthermie légère sur la différenciation et l'expansion de cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée érythrocytaire étaient très intéressants, mais ces phénomènes demeuraient partiellement inexplicables. Ainsi, il était très important et capital de comprendre le mécanisme potentiellement impliqué. En premier lieu, l'entrée en cycle cellulaire précoce observée pour les cultures maintenues à 39°C (G0 vers G1, et G1 vers S) pouvait laisser sous-entendre que la signalisation qui résulte des récepteurs de cytokines pouvait être modulée par l'hyperthermie légère, et par conséquent, l'activité des facteurs de transcription pouvait également être modifiée ou augmentée.

Telle qu'il a été décrit dans la section 1.3, l'érythropoïèse est hautement régulée d'une part par les facteurs de croissance en particulier EPO et d'autre part par les facteurs de transcription en particulier GATA-1 et STAT5a/b [143]. Brièvement, le signal initié par EPO-R via la fixation d'EPO, conduit à l'activation de JAK2, aboutissant ensuite à la phosphorylation de STAT5a/b et sa translocation nucléaire [144]. Ce dernier permet la transcription de gène codant pour Bcl-xL, et la GPA, permettant ainsi le maintien de la survie et différenciation.

Nos résultats montrent qu'une incubation des cellules à 39 °C pendant une heure sans EPO favorisait une augmentation du niveau de phosphorylation de STAT5a/b pour ces cellules. Ainsi, il se pourrait qu'en absence d'EPO, l'hyperthermie légère pourrait permettre la dimérisation d'EPO-R induisant son activation, ce qui pourrait conduire à la phosphorylation de STAT5a/b par JAK2. Une situation similaire avait en effet été rapportée pour le récepteur de EGF [129]. D'un autre côté, il se pourrait que l'activation de STAT5a/b passe par un autre sentier de signalisation distinct du récepteur de l'EPO. Il serait donc important d'analyser l'effet de l'hyperthermie légère sur les niveaux de phosphorylation des molécules impliquées dans l'activation de STAT5a/b et des autres protéines telles qu'ERK1/2 et AKT. Ces expériences pourraient se faire par l'analyse d'immunobuvardage en utilisant des extraits de cellules incubées sans EPO en condition d'hyperthermie légère avec des anticorps reconnaissant les formes phosphorylées de EPO-R, JAK2, PI3K, etc. Ceci permettrait d'apporter une image plus complète pour savoir si l'hyperthermie légère favorise directement l'activation de l'EPO-R en absence d'EPO.

Au cours de notre étude, nous avons aussi analysé le niveau de phosphorylation de STAT1 et STAT3, mais nos résultats ne montrent pas de différence significativement concluant du niveau de phosphorylation de ces STATs pour les cultures maintenues à 37 °C versus 39 °C Or ces deux STATs peuvent aussi être activés après stimulation d'EPO-R [145, 146].

Pourquoi STAT5a/b semble être modulé par l'hyperthermie légère, mais pas STAT1 et STAT3?

Il se pourrait simplement que l'activation de ces deux STATs ne soit pas nécessaire durant l'érythropoïèse. En effet, il a été prouvé que les souris anémiques en condition de stress et déficientes de STAT1 montrent une reprise normale d'érythropoïèse [147]. Par contre, le rôle exact de STAT3 dans l'érythropoïèse n'est pas clairement établi [148].

En outre, durant la maturation des cellules érythrocytes, l'expression de la protéine Bcl-xL est importante. En effet, il est connu que les souris knockout du gène Bcl-xL meurent à l'état embryonnaire, en raison d'un niveau élevé des cellules en apoptose [149]. De plus, un haut niveau de régulation (upregulation) de l'ARNm de Bcl-xL et la protéine Bcl-xL a été observé durant la maturation des cellules érythroïdes. Ainsi, il serait également intéressant d'évaluer le niveau d'expression de Bcl-xL pour les cultures maintenues à 39 °C en absence d'EPO, ainsi que le niveau d'ARNm de bcl-xL par RT-PCR.

En outre, la stimulation d'EPO-R est aussi responsable de la phosphorylation d'AKT via PI3K. Nos résultats montrent que les niveaux de phosphorylation d'AKT étaient élevés après 15 minutes d'incubation des cellules à 39 °C sans cytokines. Ces résultats pourraient être expliqués par le même mécanisme que celui décrit ci-haut pour l'activation de STAT5a/b.

Par ailleurs, l'hyperthermie légère pourrait favoriser l'activation de la voie Ras dans les cellules fibroblastes [150]. La voie Ras est aussi impliquée dans l'activation de la voie PI3K/AKT et cette dernière voie joue un rôle important dans la survie et prolifération cellulaire [151-153]. Il est donc possible que l'incubation des cellules à 39°C favorise une activation directe de Ras sans passer par EPO-R. Cette hypothèse pourrait également appuyer nos résultats, puisque nous avons aussi observé un niveau de phosphorylation plus élevé d'AKT pour les cultures maintenues à 39°C par rapport à celle à 37°C. Des

tests pour mesurer l'activité de Ras dans les cellules à 39°C seraient nécessaires pour tester cette hypothèse.

Finalement, nos résultats montraient également une augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 à 39°C. En combinant ces résultats avec ceux obtenus avec les tests des inhibiteurs, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'activation de ces voies de signalisation est en partie responsable de l'effet de l'hyperthermie légère, puisqu'une inhibition de ces voies démontre une perte importante de l'effet de l'hyperthermie légère sur la différenciation des cellules érythroïdes. Il est à noter que, le niveau de phosphorylation d'ERK1/2 et AKT ont été évalués à court terme, car l'activation de ces protéines en condition de stress se fait de façon transitoire [154, 155].

D'un autre côté, nous avons aussi vérifié le niveau de phosphorylation d'autres protéines impliquées dans la transduction du signal induit par EPO-R : à savoir, les protéines P38/MAPK, PKA et Nf-kB. Mais, nous n'avons pas observé de différence significative concluant du niveau de phosphorylation de ces protéines pour les cultures maintenues à 37 °C versus 39 °C Or ces protéines sont également impliquées dans la différenciation et la survie cellulaire.

Quels pourraient donc être les rôles de ces protéines dans la différenciation des cellules érythroïdes en condition d'hyperthermie légère?

Tout d'abord, il est connu que la protéine P38/MAPK pourrait avoir différents rôles en fonction du type cellulaire (Fig.4.1). Il est clairement prouvé que dans les conditions de stress, P38/MAPK joue un rôle important dans l'apoptose des cellules. En effet, en condition de stress, c'est la balance entre le taux d'ERK1/2 et P38/MAPK dans la cellule, qui permet à la cellule de décider si elle entre en apoptose ou survie [156-158].

Nos résultats montrent un niveau d'activation élevée d'ERK1/2 dans les cellules maintenues à 39°C, il se pourrait donc que P38/MAPK soit régulée négativement par ERK1/2. Par conséquent, il serait intéressant de vérifier le niveau de phosphorylation de

p38/MAPK au début de culture et aussi vérifier si cette phosphorylation induit une diminution du niveau de phosphorylation d'ERK1/2 pour les cultures maintenues à 37 °C versus 39 °C.

D'un autre côté, il est aussi prouvé qu'un niveau élevé HSP70 et HSP27 dans les cellules en conditions de stress pourrait permettre une inhibition de l'expression de P38/MAPK [159-161]. Nos résultats montrent un niveau d'expression de ces deux protéines dans les cellules à 39 °C. Ces différentes observations nous permettent d'expliquer nos résultats de l'analyse de P38/MAPK.

Cependant, il serait aussi intéressant d'évaluer le rôle de PKA et Nf-KB dans l'érythropoïèse en conditions de stress pour mieux comprendre leurs fonctions

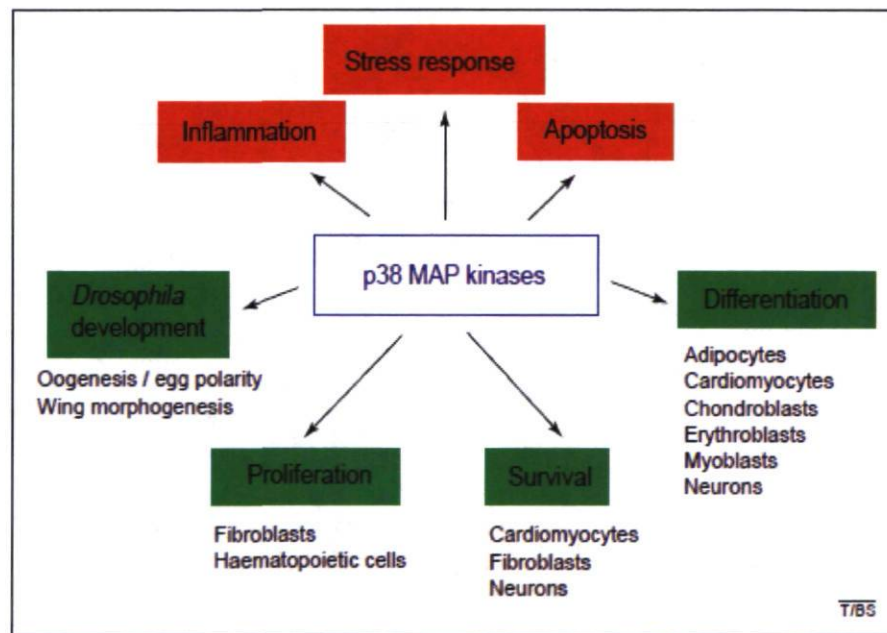


Figure 4.1 : Processus cellulaire régulé par P38/MAPK

Adaptée des travaux de Nebreda et coll.[162]

L'activation d'EPO-R conduit normalement à la phosphorylation de GATA-1 par AKT [82]. Nos résultats du test de la luciférase confirment que l'activité transcriptionnelle de GATA-1 était augmentée de façon transitoire pour les cellules maintenues à 39°C. Mais étant donné que cette analyse a été effectuée avec la lignée cellulaire UT7/EPO, il serait

aussi très important de trouver un moyen efficace pour transfecter nos cellules primaires CD34⁺ avec l'ADN plasmidique afin de confirmer ces résultats avec des cellules primaires.

De façon générale, nos résultats montrent une augmentation transitoire de l'activité de GATA-1 à 39 °C Ceci suggère fortement que les effets de l'hyperthermie légère sur la différenciation des cellules érythroïdes passent probablement en partie par ce facteur de transcription clé dans le processus de l'érythropoïèse.

Dans les perspectives futures, il serait intéressant de vérifier l'expression des différentes cytokines hématopoïétiques et leurs récepteurs correspondants au départ de culture. Ceci dans le but de répondre à la question suivante : est-ce que les cellules CD34⁺ mises en cultures expriment au départ les récepteurs de toutes les cytokines utilisées ou certains récepteurs apparaissent plus tard en cours de cultures ? Si certains récepteurs apparaissent plus tôt dans la culture, il serait important de vérifier si cet effet est dû à l'hyperthermie légère.

4.3.2. Régulation du niveau d'expression des HSPs à 39 °C

En nous basant sur les résultats de Ribeil et coll. [123], qui évoquaient que la protéine HSP70 est exprimée constitutivement par les cellules érythroïdes en différenciation et que cette dernière protège GATA-1 contre le clivage par la caspase-3, nous avons vérifié le niveau d'expression de HSP70 pour nos différentes cultures. Nos résultats montrent que HSP70 est fortement exprimée dans les cultures maintenues à 39 °C. Il se pourrait donc que dans nos cultures maintenues à 39°C, qu'il y ait un niveau de protection plus élevé de GATA-1, conduisant ainsi à l'accélération de la différenciation des cellules érythroïdes. Par contre, nous n'avons pas été en mesure d'observer de façon reproductible une augmentation des taux totaux de GATA-1 (ou GATA-1(pS310)) dans les cellules maintenues à 39°C. Cependant, il serait essentiel d'effectuer une analyse d'immunoprécipitation afin de confirmer s'il y a vraiment une forte interaction entre GATA-1 et HSP70 dans les cultures maintenues en condition d'hyperthermie légère. IL serait aussi intéressant d'utiliser un lentivirus afin de surexprimer HSP70 dans les cellules à 37°C, et de déterminer si cela pourrait mimer l'effet de l'hyperthermie légère sur la différenciation des cellules érythroïdes à 39°C.

Par ailleurs, nos analyses d'immunobuvardage montrent aussi que les niveaux d'expression de HSP27 et HSP60 étaient légèrement augmentés après une incubation des cellules à 39 °C (pour une nuit). Par contre, le rôle direct et bien défini de ces deux protéines dans l'érythropoïèse n'est pas encore connu. Néanmoins, il a été prouvé que HSP27 et HSP60 protègent les cellules contre l'apoptose en induisant l'inactivation de la caspase-3 [128]. Or c'est cette même protéine qui est activée lors de la différenciation terminale des cellules érythroïdes et qui conduit au clivage de GATA-1. Il y a donc une possibilité que ces deux protéines assurent le même rôle que HSP70 dans l'érythropoïèse. Ainsi, telle que décrite pour HSP70, l'utilisation de lentivirus pour surexprimer ou de sous-exprimer HSP27 et HSP60 (avec des ShRNA) serait une piste intéressante à suivre afin de déterminer les rôles de ces protéines chaperonnes dans l'érythropoïèse.

Quant à HSP90, nous n'avons pas observé de différence significative pour les cultures maintenues à 39 °C versus 37°C, et ce, même en utilisant une faible concentration de protéine (soit 1 et 2 µg). Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que HSP90 est la chaperonne la plus abondante et qui exprimée de façon constitutive par toutes les cellules [128]. Par contre, il est également connu que HSP90 forme un complexe avec AKT, protégeant ainsi ce dernier contre la protéine phosphatase 2A (PP2A)[163]. Par ailleurs, la phosphorylation d'AKT pourrait permettre la phosphorylation de Bcl2 protégeant ainsi les cellules contre l'apoptose [164]. En tenant compte de nos résultats de l'effet de l'hyperthermie légère sur la phosphorylation d'AKT, il se pourrait que HSP90 ait un rôle dans l'érythropoïèse, et ce, de façon directe ou indirecte.

Nous avons aussi évalué le niveau de phosphorylation de HSF-1 (Heat Shock Factor-1), en utilisant plusieurs cinétiques d'exposition à 39 °C (soit 15, 30, 45 minutes et 1 h, résultats non montrés). Mais nous n'avons pas observé de différence d'expression significative de cette protéine entre les cultures maintenues à 37 °C et 39 °C. Cependant, il a été clairement établi qu'une surexpression de HSP70, induit une inhibition de HSF-1[165]. Il est donc possible que le même phénomène soit observé dans nos cellules. Ainsi, il serait intéressant de clarifier cette situation, en évaluant le niveau d'expression de HSF-1 à 39 °C à très court terme.

4.4. Comparaison des résultats des effets à 39°C sur l'érythropoïèse et mégacaryopoïèse

Nous avons obtenu des résultats semblables de l'effet de l'hyperthermie légère sur l'expansion des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation de la lignée des cellules érythrocytaires et Cellules MKs [115, 116]. En bref, dans les deux cas nous observons une augmentation de l'expansion des cellules à 39 °C, un phénomène qui est accompagné d'une accélération de la différenciation et de la maturation des cellules MKs et érythroïdes.

Quels pourraient être les facteurs potentiels permettant d'expliquer cette similarité des résultats ?

En premier lieu, les cellules érythroïdes et Cellules MKs proviennent d'un progéniteur commun (MEP) [166], par conséquent, il se pourrait que le progéniteur bipotent MEP soit favorisé par l'hyperthermie légère, ce qui expliquerait l'augmentation de l'expansion des cellules CD34⁺ à 39°C vers ces deux voies.

Par ailleurs, ces deux lignées partagent aussi en commun les facteurs de transcription régulateurs de l'érythropoïèse et de la mégacaryopoïèse. En effet, le facteur de transcription GATA-1 et son cofacteur FOG-1 sont des molécules vitales pour la différenciation des cellules érythroïdes et des Cellules MKs [133]. Cette hypothèse a été confirmée par Crispino et coll. [167], lesquels ont induit une mutation au domaine N-terminal de GATA-1 (site de liaison de FOG-1) pour réduire l'interaction entre GATA-1 et FOG-1, ceci a résulté à l'apparition d'une sévère anémie dysérythropoïétique et la thrombocytopénie in vivo [168]. Nos résultats montrent une activation rapide transitoire de GATA-1, ceci pourrait sous-entendre que l'hyperthermie légère permet une activation des voies régulées par GATA-1 et FOG-1 dans les cellules CD34⁺ en condition d'hyperthermie légère, et ceci pourrait aussi permettre d'expliquer la différenciation hâtive des cellules érythroïdes et des cellules MKs (c'est-à-dire l'apparition rapide des cellules exprimant la GPA ou CD42b). En conséquence, il pourrait y avoir plusieurs

mécanismes permettant d'expliquer l'effet de l'hyperthermie légère sur l'expansion des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée érythrocytaire et cellules MKs, ainsi que sur l'accélération de la différenciation et de leur maturation. Ainsi, il est essentiel de répondre à la question suivante pour permettre de comprendre ce phénomène.

Est-ce qu'il est possible que les mécanismes impliqués dans l'effet de l'hyperthermie légère sur l'érythropoïèse soient aussi impliqués dans l'effet de l'hyperthermie légère sur la mégacaryopoïèse?

Pour répondre à cette question, nous devons analyser les similarités entre les récepteurs des cytokines régulatrices (EPO-R et c-Mpl pour les cellules MKs) de la différenciation des cellules MKs et les cellules érythroïdes. En effet, il y a une forte homologie entre EPO-R et c-Mpl [41]. De ce fait, la transduction du signal induit par les deux récepteurs est aussi similaire.

D'après ce qui peut être observé sur la Fig.4.2, et discuté à la section 1.3.6, la liaison de TPO et EPO à leurs récepteurs respectifs conduit à l'activation des mêmes voies de signalisation. En effet, après stimulation des deux récepteurs, il y a autophosphorylation de JAK2, conduisant à la phosphorylation de STAT5a/b et translocation nucléaire de ce dernier, où il permet la transcription des gènes codant pour la protéine anti-apoptotique Bcl-xL. La stimulation des deux récepteurs induit aussi l'activation d'ERK1/2 qui joue un rôle fondamental dans la survie et la prolifération cellulaire. Ainsi, il se pourrait bien que l'hyperthermie légère enclenche l'activation des récepteurs EPO-R et c-Mpl à la surface des cellules, et que cela résulte en l'acheminement de signaux favorisant la différenciation et la prolifération le long des voies cellules érythroïdes et Cellules MKs. Des travaux supplémentaires sont donc requis pour évaluer la similarité des mécanismes potentiellement impliqués dans l'effet de l'hyperthermie légère sur les Cellules MKs.

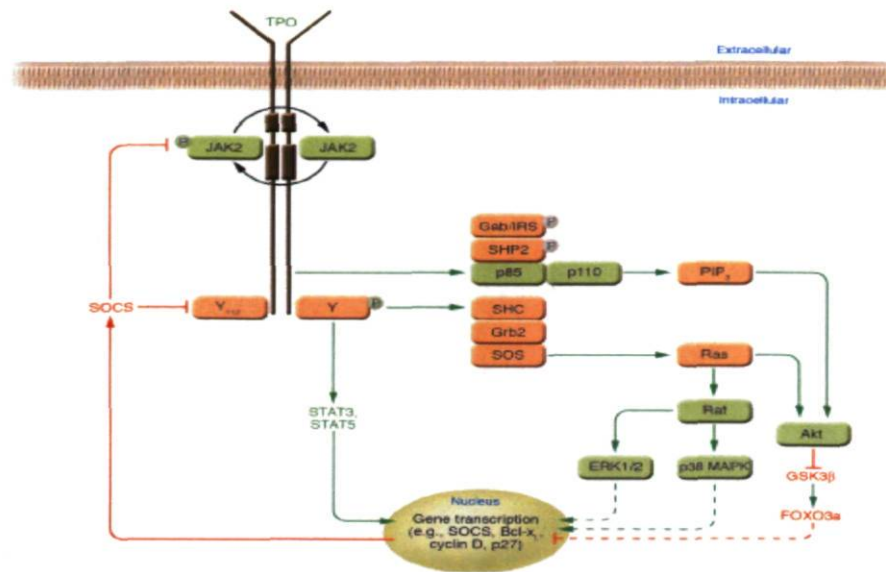


Figure 4.2 : Voie de signalisation activée par la thrombopoïétine

Image tirée des travaux de Kaushansky et coll.[169]

4.5. Comparaison des résultats des effets à 39°C sur l'expansion des cellules granulocytaires et monocytaires

Nos résultats démontrent que l'hyperthermie légère favorise une légère augmentation des cellules CD34⁺ en condition favorisant la lignée granulocytaire et à un effet négatif sur les cellules CD34⁺ en condition favorisant la lignée monocytaires. Par contre, la différenciation et la maturation de ces deux lignées étaient fortement accélérées à 39°C. Ainsi, il serait important de répondre à la question suivante pour permettre de comprendre ce phénomène.

Pourquoi l'hyperthermie légère n'a pas des effets aussi avantageux sur l'expansion de ces deux lignées?

Les cellules granulocytes, les cellules monocytes, les cellules érythroïdes et les cellules MKs proviennent du même progéniteur multipotents GEMM [41]. Par ailleurs, tout comme les cellules érythroïdes et les cellules MKs, les cellules granulocytes et les cellules monocytes sont issues d'un progéniteur commun (GMP). Les résultats à ce

niveau sont difficiles à interpréter, car nos essais de l'effet de l'hyperthermie légère sur les progéniteurs semblent montrer que la température accentue l'expansion de ces progéniteurs au début de culture. Il n'est donc pas possible d'expliquer le résultat de l'effet de l'hyperthermie légère sur les cellules granulocytes et les cellules monocytes à ce niveau.

Par contre, il se peut que les monocytes soient tout simplement plus sensibles à l'effet de l'hyperthermie légère, car nous avons observé une baisse importante de la viabilité dans les cultures en condition d'hyperthermie légère, et ce, à partir du 10^{ième} jour de culture des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation de la lignée monocyttaire. Cela pourrait être dû par exemple à une plus faible capacité d'augmenter l'expression des protéines de choc thermique, ou encore elles pourraient être plus sensibles à l'apoptose ou la nécrose induite par la chaleur. Des tests supplémentaires avec l'annexin V seront nécessaires, afin de déterminer si l'hyperthermie légère accentue l'apoptose ou la nécrose des cellules monocyttaires. Par ailleurs, nous avons observé une accélération de la maturation des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation des cellules de la lignée monocyttaire, de ce fait, la baisse de viabilité pourrait conjointement être due à la maturation accélérée des cellules monocyttaires à 39 °C. Ainsi, cette accélération de la maturation pourrait être responsable de cette diminution importante d'expansion observée à partir du jour 7 de culture.

Par ailleurs, HSP27 forme un complexe avec AKT dans les cellules neutrophiles, ce qui permet d'assurer la survie cellulaire par inhibition de l'apoptose [124]. Par conséquent, il serait intéressant d'évaluer le niveau d'expression de HSP27 à 37°C versus 39°C des cellules CD34⁺ en condition favorisant la différenciation de la lignée granulocytaire, il serait également essentiel d'effectuer aussi une analyse d'immunoprécipitation afin de confirmer si une interaction entre AKT/HSP27 est nécessaire et suffisante pour protéger les cellules CD34⁺ contre l'apoptose en condition d'hyperthermie légère vers la voie des cellules granulocytes.

Pour finir, il reste aussi plusieurs autres points à éclairer afin de déterminer pourquoi l'hyperthermie légère a des effets si différents sur les cellules érythroïdes, granulocytes et

monocytes. Les sentiers de signalisation, l'augmentation des protéines de choc thermique et les effets sur les facteurs de transcription sont tous des points qui pourront permettre d'expliquer les différents effets observés avec les cellules monocytes. Des études suivant les mêmes principes que ceux utilisés dans le cadre de l'étude des mécanismes impliqués dans l'hyperthermie légère avec les cellules érythroïdes pourraient certainement permettre de mieux comprendre ces divergences.

5. Conclusion

Le phénomène entourant les effets de l'hyperthermie légère sur la différenciation et l'expansion des cellules de la lignée myéloïde reste encore partiellement expliqué. Les cellules érythroïdes et les cellules MKs semblent répondre de façon similaire à l'hyperthermie légère. Les cellules granulocytes semblent aussi répondre de façon positive à l'hyperthermie légère. Par contre, les cellules monocytes semblent être plus sensibles comparativement aux autres cellules de la lignée myéloïde. Cette étude avait pour but, d'une part d'identifier l'impact de l'hyperthermie légère sur la lignée myéloïde, et par la suite, de caractériser et cibler le ou les mécanisme(s) potentiellement impliqué(s).

De façon générale et globale, nous avons montré que l'hyperthermie légère favorise un accroissement de la prolifération et une accélération de la différenciation vers la voie des cellules érythroïdes. Nous pensons que cette augmentation de la prolifération est probablement due à l'entrée plus rapide des cellules en cycle à 39 °C. De plus, nous avons observé que l'accélération de la différenciation à 39 °C pourrait aussi conduire à une maturation plus rapide des cellules à 39°C, aboutissant ainsi à la génération de globules rouges en culture *ex vivo*. Nos résultats semblent également indiquer que les effets de l'hyperthermie légère sont modulés en partie par l'activation de STAT5a/b, ERK1/2 et AKT, car l'inhibition de ces voies diminuait énormément l'effet de l'hyperthermie légère sur la différenciation des cellules CD34⁺ le long de la voie des cellules érythroïdes. Finalement, les essais de la luciférase ont montré une activation transitoire de GATA-1 dans les cellules à 39 °C. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que les voies de régulation normales de l'érythropoïèse sont ciblées directement ou indirectement par l'hyperthermie légère.

De plus, cette étude ouvre une nouvelle avenue sur la génération de globules rouges *ex vivo* qui pourrait permettre de répondre au besoin transfusionnel grandissant. Il serait certainement important de tester la fonctionnalité des globules rouges générés *ex vivo* à 39 °C. De tels tests pourraient se faire par des transfusions des globules rouges produits *ex vivo* dans des souris immunodéficientes.

En conclusion, les différents résultats obtenus dans cette étude nous ont permis d'apporter une meilleure compréhension au phénomène. À cet égard de l'hyperthermie légère, maintenant nous connaissons partiellement les molécules potentiellement impliquées dans l'effet de l'hyperthermie légère et aussi les voies de signalisation cruciales pour le succès de cet effet. Bien entendu, d'autres travaux seront nécessaires afin de mieux cerner les mécanismes impliqués et d'expliquer la sensibilité plus élevée des monocytes à un traitement d'hyperthermie légère.

6 Bibliographie

1. Morrison SJ, Weissman IL: The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1994, 1(8):661-673.
2. Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, Weissman IL: Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* 1997, 124(10):1929-1939.
3. Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM, Chapuis B, Chopra R, Cornelissen JJ, Gale RP, Goldman JM, Loberiza FR, Jr., Hertenstein B *et al*: Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood* 2000, 95(12):3702-3709.
4. Richard Goldsby CK, Barbara Osborne: immunologie - le cours de janis kuby. Paris: DUNOD; 2001.
5. Cavazzana-Calvo M, Lagresle C, Andre-Schmutz I, Hacein-Bey-Abina S: [The bone marrow: a reserve of stem cells able to repair various tissues?]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2004, 62(2):131-138.
6. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001, 414(6859):105-111.
7. Orkin SH: Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* 2000, 1(1):57-64.
8. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL: The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995, 11:35-71.
9. Lotem J, Sachs L: Cytokine control of developmental programs in normal hematopoiesis and leukemia. *Oncogene* 2002, 21(21):3284-3294.
10. Lewin B: Gènes VI: De boeck université; 1998.
11. Ogawa M: Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993, 81(11):2844-2853.
12. Besmer P, Manova K, Duttlinger R, Huang EJ, Packer A, Gyssler C, Bachvarova RF: The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev Suppl* 1993:125-137.
13. Nocka K, Tan JC, Chiu E, Chu TY, Ray P, Traktman P, Besmer P: Molecular bases of dominant negative and loss of function mutations at the murine c-kit/white spotting locus: W37, Wv, W41 and W. *Embo J* 1990, 9(6):1805-1813.
14. Sasaki K, Ikeda K, Kawakami K, Ohe H, Yamaoka G, Watanabe R, Ohnishi H, Kawanishi K, Takahara J, Irino S: GM-CSF- and IL-3-dependent CD34 expressing myeloid cell line (SAS-1) established from CD7 and CD34 expressing acute myeloblastic leukemic cells. *Int J Hematol* 1997, 66(1):35-45.
15. Zhu J, Emerson SG: Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 2002, 21(21):3295-3313.
16. O'Shea JJ: Jaks, STATs, cytokine signal transduction, and immunoregulation: are we there yet? *Immunity* 1997, 7(1):1-11.

17. Espert L, Dusanter-Fourt I, Chelbi-Alix MK: [Negative regulation of the JAK/STAT: pathway implication in tumorigenesis]. *Bull Cancer* 2005, 92(10):845-857.
18. Ihle JN: Cytokine receptor signalling. *Nature* 1995, 377(6550):591-594.
19. Claessens YE, Fontenay-Roupie M: [Physiopathology of myelodysplastic syndromes]. *Pathol Biol (Paris)* 2002, 50(4):261-267.
20. Zermati Y, De Sepulveda P, Feger F, Letard S, Kersual J, Casteran N, Gorochov G, Dy M, Ribadeau Dumas A, Dorgham K *et al*: 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* 2003, 22(5):660-664.
21. Gregory CJ, Eaves AC: Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood* 1978, 51(3):527-537.
22. Cantor AB, Orkin SH: Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* 2002, 21(21):3368-3376.
23. Geneviève Courtois JV, Mickael Dussiot, Joëlle Kersual, Séverine Coulon, Zakia Belaid, Yael Zermati, Jean-Antoine Ribeil, Olivier Hermine: Late erythropoiesis: an aborted death? *Hematologie* 2007, 13(6):400-408.
24. Moquin J-P: Comment maximiser les données de la formule sanguine. *Médecin du Québec* 2003, 38(10).
25. Wittenberg JB, Wittenberg BA: Mechanisms of cytoplasmic hemoglobin and myoglobin function. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 1990, 19:217-241.
26. Ponka P, Richardson DR: Can ferritin provide iron for hemoglobin synthesis? *Blood* 1997, 89(7):2611-2613.
27. Orkin SH: GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 1992, 80(3):575-581.
28. Kobayashi M, Yamamoto M: Regulation of GATA1 gene expression. *J Biochem* 2007, 142(1):1-10.
29. Weiss MJ, Yu C, Orkin SH: Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line. *Mol Cell Biol* 1997, 17(3):1642-1651.
30. Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH: Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93(22):12355-12358.
31. Penny LA, Forget BG: Genomic organization of the human erythropoietin receptor gene. *Genomics* 1991, 11(4):974-980.
32. Weiss MJ, Keller G, Orkin SH: Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev* 1994, 8(10):1184-1197.
33. Pevny L, Lin CS, D'Agati V, Simon MC, Orkin SH, Costantini F: Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* 1995, 121(1):163-172.
34. Takahashi S, Onodera K, Motohashi H, Suwabe N, Hayashi N, Yanai N, Nabesima Y, Yamamoto M: Arrest in primitive erythroid cell development caused by promoter-specific disruption of the GATA-1 gene. *J Biol Chem* 1997, 272(19):12611-12615.

35. McDevitt MA, Fujiwara Y, Shivdasani RA, Orkin SH: An upstream, DNase I hypersensitive region of the hematopoietic-expressed transcription factor GATA-1 gene confers developmental specificity in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94(15):7976-7981.
36. Fox AH, Kowalski K, King GF, Mackay JP, Crossley M: Key residues characteristic of GATA N-fingers are recognized by FOG. *J Biol Chem* 1998, 273(50):33595-33603.
37. Tsang AP, Visvader JE, Turner CA, Fujiwara Y, Yu C, Weiss MJ, Crossley M, Orkin SH: FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* 1997, 90(1):109-119.
38. Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S: GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 2005, 25(4):1215-1227.
39. Sugiyama D, Tanaka M, Kitajima K, Zheng J, Yen H, Murotani T, Yamatodani A, Nakano T: Differential context-dependent effects of friend of GATA-1 (FOG-1) on mast-cell development and differentiation. *Blood* 2008, 111(4):1924-1932.
40. Tsang AP, Fujiwara Y, Hom DB, Orkin SH: Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev* 1998, 12(8):1176-1188.
41. Pang L, Weiss MJ, Poncz M: Megakaryocyte biology and related disorders. *J Clin Invest* 2005, 115(12):3332-3338.
42. Takahashi S, Ohshima T, Cho A, Sreenath T, Iadarola MJ, Pant HC, Kim Y, Nairn AC, Brady RO, Greengard P *et al*: Increased activity of cyclin-dependent kinase 5 leads to attenuation of cocaine-mediated dopamine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(5):1737-1742.
43. Rylski M, Welch JJ, Chen YY, Letting DL, Diehl JA, Chodosh LA, Blobel GA, Weiss MJ: GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation. *Mol Cell Biol* 2003, 23(14):5031-5042.
44. Kadri Z, Shimizu R, Ohneda O, Maouche-Chretien L, Gisselbrecht S, Yamamoto M, Romeo PH, Leboulch P, Chretien S: Direct binding of pRb/E2F-2 to GATA-1 regulates maturation and terminal cell division during erythropoiesis. *PLoS Biol* 2009, 7(6):e1000123.
45. Whyatt D, Lindeboom F, Karis A, Ferreira R, Milot E, Hendriks R, de Bruijn M, Langeveld A, Gribnau J, Grosveld F *et al*: An intrinsic but cell-nonautonomous defect in GATA-1-overexpressing mouse erythroid cells. *Nature* 2000, 406(6795):519-524.
46. Maritano D, Sugrue ML, Tininini S, Dewilde S, Strobl B, Fu X, Murray-Tait V, Chiarle R, Poli V: The STAT3 isoforms alpha and beta have unique and specific functions. *Nat Immunol* 2004, 5(4):401-409.
47. Horvath CM: STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci* 2000, 25(10):496-502.
48. Coffey PJ, Koenderman L, de Groot RP: The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia. *Oncogene* 2000, 19(21):2511-2522.
49. Yang E, Wen Z, Haspel RL, Zhang JJ, Darnell JE, Jr.: The linker domain of Stat1 is required for gamma interferon-driven transcription. *Mol Cell Biol* 1999, 19(7):5106-5112.

50. Kirito K, Osawa M, Morita H, Shimizu R, Yamamoto M, Oda A, Fujita H, Tanaka M, Nakajima K, Miura Y *et al*: A functional role of Stat3 in in vivo megakaryopoiesis. *Blood* 2002, 99(9):3220-3227.
51. Schuringa JJ, Chung KY, Morrone G, Moore MA: Constitutive activation of STAT5A promotes human hematopoietic stem cell self-renewal and erythroid differentiation. *J Exp Med* 2004, 200(5):623-635.
52. Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, Brugnara C, Lodish HF: Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* 1999, 98(2):181-191.
53. Grebien F, Kerenyi MA, Kovacic B, Kolbe T, Becker V, Dolznig H, Pfeffer K, Klingmuller U, Muller M, Beug H *et al*: Stat5 activation enables erythropoiesis in the absence of EpoR and Jak2. *Blood* 2008, 111(9):4511-4522.
54. Olthof SG, Fatrai S, Drayer AL, Tyl MR, Vellenga E, Schuringa JJ: Downregulation of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in CD34⁺ cells promotes megakaryocytic development, whereas activation of STAT5 drives erythropoiesis. *Stem Cells* 2008, 26(7):1732-1742.
55. Palis J: Developmental biology: no red cell is an island. *Nature* 2004, 432(7020):964-965.
56. Hanspal M, Hanspal JS: The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: a 30-kD heparin-binding protein is involved in this contact. *Blood* 1994, 84(10):3494-3504.
57. Sadahira Y, Yoshino T, Monobe Y: Very late activation antigen 4-vascular cell adhesion molecule 1 interaction is involved in the formation of erythroblastic islands. *J Exp Med* 1995, 181(1):411-415.
58. Leung CG, Xu Y, Mularski B, Liu H, Gurbuxani S, Crispino JD: Requirements for survivin in terminal differentiation of erythroid cells and maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells. *J Exp Med* 2007, 204(7):1603-1611.
59. Koury ST, Koury MJ, Bondurant MC: Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts. *J Cell Biol* 1989, 109(6 Pt 1):3005-3013.
60. Ghaffari S, Kitidis C, Fleming MD, Neubauer H, Pfeffer K, Lodish HF: Erythropoiesis in the absence of janus-kinase 2: BCR-ABL induces red cell formation in JAK2^(-/-) hematopoietic progenitors. *Blood* 2001, 98(10):2948-2957.
61. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF: Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 1995, 83(1):59-67.
62. Lin CS, Lim SK, D'Agati V, Costantini F: Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev* 1996, 10(2):154-164.
63. Ebert BL, Bunn HF: Regulation of the erythropoietin gene. *Blood* 1999, 94(6):1864-1877.
64. Jelkmann W: Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 2004, 43(8):649-659.

65. Iscove NN, Nawa K: Hematopoietic stem cells expand during serial transplantation in vivo without apparent exhaustion. *Curr Biol* 1997, 7(10):805-808.
66. Liang G, Stephenson AH, Lonigro AJ, Sprague RS: Erythrocytes of humans with cystic fibrosis fail to stimulate nitric oxide synthesis in isolated rabbit lungs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005, 288(4):H1580-1585.
67. Remy B, Deby-Dupont G, Lamy M: Red blood cell substitutes: fluorocarbon emulsions and haemoglobin solutions. *Br Med Bull* 1999, 55(1):277-298.
68. Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B, Lin CS, Nikodem VM, Hempstead B, Flanders KC *et al*: Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development* 2002, 129(2):505-516.
69. Constantinescu SN, Ghaffari S, Lodish HF: The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction. *Trends Endocrinol Metab* 1999, 10(1):18-23.
70. Neubauer H, Cumano A, Muller M, Wu H, Huffstadt U, Pfeffer K: Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 1998, 93(3):397-409.
71. Sathyanarayana P, Dev A, Fang J, Houde E, Bogacheva O, Bogachev O, Menon M, Browne S, Pradeep A, Emerson C *et al*: EPO receptor circuits for primary erythroblast survival. *Blood* 2008, 111(11):5390-5399.
72. Digicaylioglu M, Lipton SA: Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature* 2001, 412(6847):641-647.
73. Wakao H, Harada N, Kitamura T, Mui AL, Miyajima A: Interleukin 2 and erythropoietin activate STAT5/MGF via distinct pathways. *Embo J* 1995, 14(11):2527-2535.
74. Damen JE, Wakao H, Miyajima A, Kros J, Humphries RK, Cutler RL, Krystal G: Tyrosine 343 in the erythropoietin receptor positively regulates erythropoietin-induced cell proliferation and Stat5 activation. *Embo J* 1995, 14(22):5557-5568.
75. Silva M, Benito A, Sanz C, Prosper F, Ekhterae D, Nunez G, Fernandez-Luna JL: Erythropoietin can induce the expression of bcl-x(L) through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines. *J Biol Chem* 1999, 274(32):22165-22169.
76. Damen JE, Mui AL, Puil L, Pawson T, Krystal G: Phosphatidylinositol 3-kinase associates, via its Src homology 2 domains, with the activated erythropoietin receptor. *Blood* 1993, 81(12):3204-3210.
77. Kirito K, Uchida M, Takatoku M, Nakajima K, Hirano T, Miura Y, Komatsu N: A novel function of Stat1 and Stat3 proteins in erythropoietin-induced erythroid differentiation of a human leukemia cell line. *Blood* 1998, 92(2):462-471.
78. von Lindern M, Parren-van Amelsvoort M, van Dijk T, Deiner E, van den Akker E, van Emst-de Vries S, Willems P, Beug H, Lowenberg B: Protein kinase C alpha controls erythropoietin receptor signaling. *J Biol Chem* 2000, 275(44):34719-34727.

79. Kashii Y, Uchida M, Kirito K, Tanaka M, Nishijima K, Toshima M, Ando T, Koizumi K, Endoh T, Sawada K *et al*: A member of Forkhead family transcription factor, FKHL1, is one of the downstream molecules of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt activation pathway in erythropoietin signal transduction. *Blood* 2000, 96(3):941-949.
80. Bao Y, Yu R, Zhang D: [In vitro study on cellular and molecular mechanism of tripterine treating leukemic mast cells]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 1999, 20(3):146-148.
81. Zhao W, Kitidis C, Fleming MD, Lodish HF, Ghaffari S: Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood* 2006, 107(3):907-915.
82. Kadri Z, Maouche-Chretien L, Rooke HM, Orkin SH, Romeo PH, Mayeux P, Leboulch P, Chretien S: Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt induced by erythropoietin renders the erythroid differentiation factor GATA-1 competent for TIMP-1 gene transactivation. *Mol Cell Biol* 2005, 25(17):7412-7422.
83. Sui X, Krantz SB, You M, Zhao Z: Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis. *Blood* 1998, 92(4):1142-1149.
84. Wang KK, Larner SF, Robinson G, Hayes RL: Neuroprotection targets after traumatic brain injury. *Curr Opin Neurol* 2006, 19(6):514-519.
85. Johnson L, Greenbaum D, Cichowski K, Mercer K, Murphy E, Schmitt E, Bronson RT, Umanoff H, Edelman W, Kucherlapati R *et al*: K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev* 1997, 11(19):2468-2481.
86. Miyake T, Kung CK, Goldwasser E: Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1977, 252(15):5558-5564.
87. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EF *et al*: Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985, 313(6005):806-810.
88. Metcalf D: Hematopoietic cytokines. *Blood* 2008, 111(2):485-491.
89. Koury MJ, Bondurant MC: Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* 1990, 248(4953):378-381.
90. Besarab A, Sherman R: The relationship of recirculation to access blood flow. *Am J Kidney Dis* 1997, 29(2):223-229.
91. Faulds D, Sorkin EM: Epoetin (recombinant human erythropoietin). A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in anaemia and the stimulation of erythropoiesis. *Drugs* 1989, 38(6):863-899.
92. Dai CH, Krantz SB, Zsebo KM: Human burst-forming units-erythroid need direct interaction with stem cell factor for further development. *Blood* 1991, 78(10):2493-2497.
93. Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, Chalmers D, Kiger L, Cynober T, Marden MC, Wajcman H, Douay L: Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005, 23(1):69-74.

94. Dorn I, Lazar-Karsten P, Boie S, Ribbat J, Hartwig D, Driller B, Kirchner H, Schlenke P: In vitro proliferation and differentiation of human CD34+ cells from peripheral blood into mature red blood cells with two different cell culture systems. *Transfusion* 2008, 48(6):1122-1132.
95. Lu SJ, Feng Q, Park JS, Vida L, Lee BS, Strausbauch M, Wettstein PJ, Honig GR, Lanza R: Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood* 2008, 112(12):4475-4484.
96. Komatsu N, Kirito K, Shimizu R, Kunitama M, Yamada M, Uchida M, Takatoku M, Eguchi M, Miura Y: In vitro development of erythroid and megakaryocytic cells from a UT-7 subline, UT-7/GM. *Blood* 1997, 89(11):4021-4033.
97. Komatsu N, Yamamoto M, Fujita H, Miwa A, Hatake K, Endo T, Okano H, Katsube T, Fukumaki Y, Sassa S *et al*: Establishment and characterization of an erythropoietin-dependent subline, UT-7/Epo, derived from human leukemia cell line, UT-7. *Blood* 1993, 82(2):456-464.
98. Nicholson SE, Novak U, Ziegler SF, Layton JE: Distinct regions of the granulocyte colony-stimulating factor receptor are required for tyrosine phosphorylation of the signaling molecules JAK2, Stat3, and p42, p44MAPK. *Blood* 1995, 86(10):3698-3704.
99. Maun NA, Gaines P, Khanna-Gupta A, Zibello T, Enriquez L, Goldberg L, Berliner N: G-CSF signaling can differentiate promyelocytes expressing a defective retinoic acid receptor: evidence for divergent pathways regulating neutrophil differentiation. *Blood* 2004, 103(5):1693-1701.
100. Tidow N, Pilz C, Kasper B, Welte K: Frequency of point mutations in the gene for the G-CSF receptor in patients with chronic neutropenia undergoing G-CSF therapy. *Stem Cells* 1997, 15 Suppl 1:113-119; discussion 120.
101. Wang W, Wang X, Ward AC, Touw IP, Friedman AD: C/EBPalpha and G-CSF receptor signals cooperate to induce the myeloperoxidase and neutrophil elastase genes. *Leukemia* 2001, 15(5):779-786.
102. Nakajima H, Ihle JN: Granulocyte colony-stimulating factor regulates myeloid differentiation through CCAAT/enhancer-binding protein epsilon. *Blood* 2001, 98(4):897-905.
103. Zhang DE, Zhang P, Wang ND, Hetherington CJ, Darlington GJ, Tenen DG: Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94(2):569-574.
104. Smith LT, Hohaus S, Gonzalez DA, Dziennis SE, Tenen DG: PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood* 1996, 88(4):1234-1247.
105. Mischak H, Pierce JH, Goodnight J, Kazanietz MG, Blumberg PM, Mushinski JF: Phorbol ester-induced myeloid differentiation is mediated by protein kinase C-alpha and -delta and not by protein kinase C-beta II, -epsilon, -zeta, and -eta. *J Biol Chem* 1993, 268(27):20110-20115.
106. Zhang DE, Fujioka K, Hetherington CJ, Shapiro LH, Chen HM, Look AT, Tenen DG: Identification of a region which directs the monocytic activity of the colony-stimulating factor 1 (macrophage colony-stimulating factor) receptor promoter and binds PEBP2/CBF (AML1). *Mol Cell Biol* 1994, 14(12):8085-8095.

107. Petrovick MS, Hiebert SW, Friedman AD, Hetherington CJ, Tenen DG, Zhang DE: Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1. *Mol Cell Biol* 1998, 18(7):3915-3925.
108. Bassuk AG, Leiden JM: A direct physical association between ETS and AP-1 transcription factors in normal human T cells. *Immunity* 1995, 3(2):223-237.
109. Behre G, Whitmarsh AJ, Coghlan MP, Hoang T, Carpenter CL, Zhang DE, Davis RJ, Tenen DG: c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor. *J Biol Chem* 1999, 274(8):4939-4946.
110. Pan Z, Hetherington CJ, Zhang DE: CCAAT/enhancer-binding protein activates the CD14 promoter and mediates transforming growth factor beta signaling in monocyte development. *J Biol Chem* 1999, 274(33):23242-23248.
111. Querfurth E, Schuster M, Kulesa H, Crispino JD, Doderlein G, Orkin SH, Graf T, Nerlov C: Antagonism between C/EBPbeta and FOG in eosinophil lineage commitment of multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev* 2000, 14(19):2515-2525.
112. Yamaguchi Y, Ackerman SJ, Minegishi N, Takiguchi M, Yamamoto M, Suda T: Mechanisms of transcription in eosinophils: GATA-1, but not GATA-2, transactivates the promoter of the eosinophil granule major basic protein gene. *Blood* 1998, 91(9):3447-3458.
113. Kulesa H, Frampton J, Graf T: GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblats. *Genes Dev* 1995, 9(10):1250-1262.
114. Schweitzer BL, DeKoter RP: Analysis of gene expression and Ig transcription in PU.1/Spi-B-deficient progenitor B cell lines. *J Immunol* 2004, 172(1):144-154.
115. Proulx C, Dupuis N, St-Amour I, Boyer L, Lemieux R: Increased megakaryopoiesis in cultures of CD34-enriched cord blood cells maintained at 39 degrees C. *Biotechnol Bioeng* 2004, 88(6):675-680.
116. Pineault N, Boucher JF, Cayer MP, Palmqvist L, Boyer L, Lemieux R, Proulx C: Characterization of the effects and potential mechanisms leading to increased megakaryocytic differentiation under mild hyperthermia. *Stem Cells Dev* 2008, 17(3):483-493.
117. Morimoto R, Fodor E: Cell-specific expression of heat shock proteins in chicken reticulocytes and lymphocytes. *J Cell Biol* 1984, 99(4 Pt 1):1316-1323.
118. Davis JQ, Dansereau D, Johnstone RM, Bennett V: Selective externalization of an ATP-binding protein structurally related to the clathrin-uncoating ATPase/heat shock protein in vesicles containing terminal transferrin receptors during reticulocyte maturation. *J Biol Chem* 1986, 261(33):15368-15371.
119. Singh MK, Yu J: Accumulation of a heat shock-like protein during differentiation of human erythroid cell line K562. *Nature* 1984, 309(5969):631-633.
120. Banerji SS, Theodorakis NG, Morimoto RI: Heat shock-induced translational control of HSP70 and globin synthesis in chicken reticulocytes. *Mol Cell Biol* 1984, 4(11):2437-2448.
121. De Maria R, Testa U, Luchetti L, Zeuner A, Stassi G, Pelosi E, Riccioni R, Felli N, Samoggia P, Peschle C: Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood* 1999, 93(3):796-803.

122. De Maria R, Zeuner A, Eramo A, Domenichelli C, Bonci D, Grignani F, Srinivasula SM, Alnemri ES, Testa U, Peschle C: Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 1999, 401(6752):489-493.
123. Ribeil JA, Zermati Y, Vandekerckhove J, Cathelin S, Kersual J, Dussiot M, Coulon S, Moura IC, Zeuner A, Kirkegaard-Sorensen T *et al*: Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 2007, 445(7123):102-105.
124. Rane MJ, Pan Y, Singh S, Powell DW, Wu R, Cummins T, Chen Q, McLeish KR, Klein JB: Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *J Biol Chem* 2003, 278(30):27828-27835.
125. Oesterreich S, Weng CN, Qiu M, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Fuqua SA: The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 1993, 53(19):4443-4448.
126. Whitesell L, Lindquist SL: HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 2005, 5(10):761-772.
127. Sreedhar AS, Csermely P: Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2004, 101(3):227-257.
128. Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C: Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med* 2008, 12(3):743-761.
129. Lin RZ, Hu ZW, Chin JH, Hoffman BB: Heat shock activates c-Src tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in NIH3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 1997, 272(49):31196-31202.
130. Sharif-Khatibi L, Kariminia A, Khoei S, Goliaei B: Hyperthermia induces differentiation without apoptosis in permissive temperatures in human erythroleukaemia cells. *Int J Hyperthermia* 2007, 23(8):645-655.
131. Park HG, Han SI, Oh SY, Kang HS: Cellular responses to mild heat stress. *Cell Mol Life Sci* 2005, 62(1):10-23.
132. de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang WJ *et al*: Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 1994, 369(6481):533-538.
133. Gurney AL, Carver-Moore K, de Sauvage FJ, Moore MW: Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science* 1994, 265(5177):1445-1447.
134. Jordan CT, Yamasaki G, Minamoto D: High-resolution cell cycle analysis of defined phenotypic subsets within primitive human hematopoietic cell populations. *Exp Hematol* 1996, 24(11):1347-1355.
135. Krutzik PO, Nolan GP: Fluorescent cell barcoding in flow cytometry allows high-throughput drug screening and signaling profiling. *Nat Methods* 2006, 3(5):361-368.
136. Racke FK, Wang D, Zaidi Z, Kelley J, Visvader J, Soh JW, Goldfarb AN: A potential role for protein kinase C-epsilon in regulating megakaryocytic lineage commitment. *J Biol Chem* 2001, 276(1):522-528.

137. Wang X, Crispino JD, Letting DL, Nakazawa M, Poncz M, Blobel GA: Control of megakaryocyte-specific gene expression by GATA-1 and FOG-1: role of Ets transcription factors. *EMBO J* 2002, 21(19):5225-5234.
138. Muta K, Krantz SB, Bondurant MC, Dai CH: Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation. *Blood* 1995, 86(2):572-580.
139. Traycoff CM, Abboud MR, Laver J, Clapp DW, Srour EF: Rapid exit from G0/G1 phases of cell cycle in response to stem cell factor confers on umbilical cord blood CD34+ cells an enhanced ex vivo expansion potential. *Exp Hematol* 1994, 22(13):1264-1272.
140. Leitner A, Strobl H, Fischmeister G, Kurz M, Romanakis K, Haas OA, Printz D, Buchinger P, Bauer S, Gardner H *et al*: Lack of DNA synthesis among CD34+ cells in cord blood and in cytokine-mobilized blood. *Br J Haematol* 1996, 92(2):255-262.
141. Koenig JM, Luttge B, Benson NA, Christensen RD: Cell cycle status of CD34+ cells in human fetal bone marrow. *Early Hum Dev* 2001, 65(2):159-163.
142. Han S, Park K, Bae BN, Kim KH, Kim HJ, Kim YD, Kim HY: Cyclin D1 expression and patient outcome after tamoxifen therapy in estrogen receptor positive metastatic breast cancer. *Oncol Rep* 2003, 10(1):141-144.
143. Friedman BETaJS: Erythropoiesis: an overview 2nd Revised and Extended Edition edn: Birkhäuser Basel 2009.
144. Sasaki A, Yasukawa H, Shouda T, Kitamura T, Dikic I, Yoshimura A: CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J Biol Chem* 2000, 275(38):29338-29347.
145. Wojchowski DM, Gregory RC, Miller CP, Pandit AK, Pircher TJ: Signal transduction in the erythropoietin receptor system. *Exp Cell Res* 1999, 253(1):143-156.
146. Cheung JY, Miller BA: Molecular mechanisms of erythropoietin signaling. *Nephron* 2001, 87(3):215-222.
147. Halupa A, Bailey ML, Huang K, Iscove NN, Levy DE, Barber DL: A novel role for STAT1 in regulating murine erythropoiesis: deletion of STAT1 results in overall reduction of erythroid progenitors and alters their distribution. *Blood* 2005, 105(2):552-561.
148. Kirito K, Nakajima K, Watanabe T, Uchida M, Tanaka M, Ozawa K, Komatsu N: Identification of the human erythropoietin receptor region required for Stat1 and Stat3 activation. *Blood* 2002, 99(1):102-110.
149. Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Negishi I, Senju S, Zhang Q, Fujii S, *et al*.: Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* 1995, 267(5203):1506-1510.
150. Han SI, Oh SY, Woo SH, Kim KH, Kim JH, Kim HD, Kang HS: Implication of a small GTPase Rac1 in the activation of c-Jun N-terminal kinase and heat shock factor in response to heat shock. *J Biol Chem* 2001, 276(3):1889-1895.
151. Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordan J, Bellacosa A, Tsichlis PN, Hay N: The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev* 1997, 11(6):701-713.

152. Kulik G, Klippel A, Weber MJ: Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol* 1997, 17(3):1595-1606.
153. Brognard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA: Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res* 2001, 61(10):3986-3997.
154. Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Tanaka M, Shiojima I, Hiroi Y, Yazaki Y: Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J Clin Invest* 1997, 100(7):1813-1821.
155. Terada K, Kaziro Y, Satoh T: Ras-dependent activation of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase in response to interleukin-3 stimulation in hematopoietic BaF3 cells. *J Biol Chem* 1997, 272(7):4544-4548.
156. Wada T, Penninger JM: Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 2004, 23(16):2838-2849.
157. Kyosseva SV: Mitogen-activated protein kinase signaling. *Int Rev Neurobiol* 2004, 59:201-220.
158. Minden A, Lin A, Claret FX, Abo A, Karin M: Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 1995, 81(7):1147-1157.
159. Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Caron AW, Rits S, Shifrin VI, Sherman MY: Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J Biol Chem* 1997, 272(29):18033-18037.
160. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B: Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997, 17(9):5317-5327.
161. Landry J, Lambert H, Zhou M, Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, Anderson CW: Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II. *J Biol Chem* 1992, 267(2):794-803.
162. Nebreda AR, Porras A: p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci* 2000, 25(6):257-260.
163. Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tsichlis P, Rosen N: Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J Biol Chem* 2002, 277(42):39858-39866.
164. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME: Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997, 91(2):231-241.
165. Ding XZ, Tsokos GC, Kiang JG: Overexpression of HSP-70 inhibits the phosphorylation of HSF1 by activating protein phosphatase and inhibiting protein kinase C activity. *FASEB J* 1998, 12(6):451-459.
166. Frontelo P, Manwani D, Galdass M, Karsunky H, Lohmann F, Gallagher PG, Bieker JJ: Novel role for EKLF in megakaryocyte lineage commitment. *Blood* 2007, 110(12):3871-3880.

167. Crispino JD, Lodish MB, Thurberg BL, Litovsky SH, Collins T, Molkentin JD, Orkin SH: Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors. *Genes Dev* 2001, 15(7):839-844.
168. Nichols KE, Crispino JD, Poncz M, White JG, Orkin SH, Maris JM, Weiss MJ: Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet* 2000, 24(3):266-270.
169. Kaushansky K: The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest* 2005, 115(12):3339-3347.