MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE
présenté
par
Grimaldi/Marchesi Alexandra

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Expression de la protéine Emp/MAEA (*Erythroblast macrophage protein/ Macrophage Erythroblast Attacher*) dans la différenciation érythrocytaire terminale

Soutenu le 31/10/2018

devant le jury suivant :
- *Mme Dominique Bluteau* – **Présidente**
- *Mme Monique Silvy* – **Tuteur scientifique**
- *Mr Maxime Ratinier* – **Tuteur pédagogique**
- *Mme Laurence Guyonneau-Harmand* – **Rapporteur**
- *Mr le Professeur Jacques Chiaroni* – **Examinateur**
- *Mr Eric Mas* - **Examinateur**

Mémoire préparé sous la direction de :
Mme SILVY Monique – Tuteur Scientifique

Intitulé de la structure d'accueil : *Biologie des Groupes Sanguins, UMR7268 ADES, AMU/EFS/CNRS Faculté de Médecine Timone 4ème étage aile Rouge, 27 bd Jean Moulin 13005 Marseille*
Directeur : *Mr BAILLY Pascal*

et de

Mr Ratinier Maxime – Tuteur pédagogique

Intitulé de la structure d'accueil EPHE : UMR754, Infections Virales et Pathologie Comparée (IVPC), INRA, UCBL1, EPHE, 50 Avenue Tony Garnier, Lyon cedex 07
Directeur : Mme Fabienne ARCHER
EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)
Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématiques de l'EPHE : Les Cellules et leur Environnement, Dynamique des Interactions (CEDI)

Remerciements

Je souhaite remercier mon directeur de laboratoire Pascal Bailly, pour l'aide qu'il a fournie et les connaissances qu'il a su me transmettre. Je le remercie également pour sa disponibilité et la qualité de ses conseils.

Je remercie également Jacques Chiaroni, directeur de l'EFS-PACA Corse d'avoir validé et accepté le financement de l'intégralité de cette formation mais également pour avoir accepté la fonction d'examinateur.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma tutrice scientifique, Monique Silvy, sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui. Merci pour ton investissement, ton savoir, tes précieux conseils, ta disponibilité, ta gentillesse, tu as toujours été présente quand j'avais besoin de toi et je t'en remercie infiniment. Merci de m'avoir accompagnée et fait confiance pour ce projet.

Je remercie aussi mon tuteur pédagogique, Maxime Ratinier, qui s'est régulièrement intéressé à mon travail, et a toujours été très réactif lors de mes demandes.

J'exprime ma reconnaissance à Madame Dominique Bluteau qui me fait l'honneur de présider ce jury, à Madame Laurence Guyonneau-Harmand pour avoir accepté la fonction de rapporteur ainsi qu'à Monsieur Eric Mas pour avoir accepté la fonction d'examinateur.

Je remercie également Christophe Picard pour son aide précieuse, sa gentillesse et sa disponibilité.

Je remercie le laboratoire CRO2 U911, tout particulièrement Françoise Silvy, pour son aide aux techniques d'immunofluorescence ainsi que pour l'accès au microscope confocal.

Je tiens à remercier tous mes collègues de travail qui m'ont aidée et guidée dans la réalisation de ce travail mais également pour m'avoir « supportée »....

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à mon mari, mes enfants, mes parents, ma sœur, ma caille et tous mes proches qui m'ont accompagnée, soutenue et encouragée tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Table des matières

Table des matières 3

Table des figures 5

Table des tableaux 5

Liste des abréviations 6

Introduction 10

1- L'érythropoïèse 13

1.1. Ontogénie et production d'hémoglobine 13

1.2. L'érythropoïèse précoce 14

1.3. L'érythropoïèse tardive 16

1.4. L'îlot érythroblastique 19

1.5. Régulation de l'érytropoïèse 22

2- La protéine Emp/MAEA (Erythroblast Macrophage Protein/Macrophage Erythroblast Attacher) 25

2.1 Du gène à la protéine 25

2.2 Rôle dans l'hématopoïèse 27

2.3 Etudes dans les cellules non hématopoïétiques 29

Objectifs 32

Matériels et méthodes 34

1- Culture en milieu liquide des cellules $CD34^+$ humaines issues de sang de cordon 35

2- Coloration May Grünwald Giemsa (MGG) 35

3- Analyse en cytométrie en flux 36

3.1 Expression de la glycophorine A et quantification de l'énucléation 37

3.2 Expression de l'hémoglobine fœtale (HbF) 38

3.3 Expression membranaire de Emp/MAEA au cours de la différenciation 38

4- Extraction d'ARN et RT-PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) 39

4.1 Extraction des ARN et reverse transcription (RT) 39

4.2 PCR quantitative en temps réel (qPCR) 40

5- Immunofluorescence 41

5.1 Marquage sur cellules non perméabilisées 41

5.2 Marquage sur cellules fixées et perméabilisées 42

6- Western Blot 43

Résultats 45

1- Mise en place du modèle de primo-cultures de cellules CD34^{+} en différenciation érythroïde 46
1.1. Détermination des stades de différenciation 46
1.2. Expression de la glycophorine A et quantification de l'énucléation 47
1.3. Expression de l'hémoglobine fœtale au cours de la différenciation 49
2- Expression Emp/MAEA au cours de la différenciation 51
2.1 Expression de la protéine totale 51
2.2 Expression membranaire de la protéine Emp/MAEA 52
Discussion et perspectives 56
1- Modèle de culture des cellules CD34+ en différenciation 57
2- Analyse de l'expression d'Emp/MAEA dans notre modèle 58
Conclusion 62
Bibliographie 65

Table des figures

Figure 1 : L'hématopoïèse. 12
Figure 2 : Expression des chaines de globine au cours du développement. 14
Figure 3 : L'érythropoïèse. 15
Figure 4 : Différents stades de l'érythropoïèse tardive. 17
Figure 5 : Îlot érythroblastique 20
Figure 6 : Principales molécules impliquées dans l'interaction érythroblastes/macrophages au sein de l'îlot érythroblastique 21
Figure 7 : Différentes étapes de l'énucléation : de la condensation de la chromatine à l'extrusion du noyau 22
Figure 8 : Facteurs régulant l'érythropoïèse. 25
Figure 9 : Domaines fonctionnels de la protéine Emp/MAEA. 26
Figure 10 : Identification des précurseurs érythroïdes. 47
Figure 11 : Expression de la GYPA et énucléation dans notre modèle de culture. 48
Figure 12 : Cinétique d'expression de l'hémoglobine fœtale. 50
Figure 13 : Expression d'Emp/MAEA au cours de la cinétique de différenciation. 52
Figure 14 : Détection de la protéine Emp/MAEA par cytométrie en flux. 53
Figure 15 : Immunofluorescence des cellules en différenciation. 55

Table des tableaux

Tableau I : Quelques exemples de marqueurs dont l'expression est régulée au cours de l'érythropoïèse 17

Tableau II : Séquences des amorces de qPCR et concentration finale 41

Tableau III : Proportion des chaines ϒ exprimées 51

Tableau IV: Quantification du transcrit Emp/MAEA mesuré par RT-qPCR 52

Tableau V : Corrélation de l'intensité du marquage Emp/MAEA avec les paramètres de la différenciation érythroïde 54

Liste des abréviations

A

aa : acides aminés

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : acide ribonucléique

ARNr : ARN ribosomal

B

Bcl-xL : B cell leukemia gene xL

BFU : burst forming unit-erythroid

BSA : albumine sérique bovine

C

CFU-Bas : colony forming unit-basophil

CFU-E : colony forming unit-erythroid

CFU-Eo : colony forming unit-eosinophil

CFU-G : colony forming unit-granulocyte

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

CFU-GM : colony forming unit-granulocyte-macrophage

CFU-M : colony forming unit-macrophage

CFU-MK : colony forming unit-megakaryocyte

Cp : Crossing point

CSH : cellule souche hématopoïétique

CSE : cellule souche embryonnaire

CTLH : C-terminal LisH motif

D

dNTP : désoxyribonucléotides

E

EDTA : éthylènediaminetétraacétique

EMP/MAEA : erythroblast macrophage protein/macrophage erythroblast attacher

EPO : érythropoïétine

EPO-R : récepteur de l'érythropoïétine

E-Acido : érythroblaste acidophile

E-Baso : érythroblaste basophile

E-Poly : érythroblaste polychromatiphile

F

FBPase : fructose 1,6-biphosphatase

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

FSC : forward scatter

FVS : fixable viability stain

G

GID : glucose induced degradation deficient

GM-CSF : granulocyte macrophage colony stimulating factor

GMP : granulocyte/monocyte progenitor

GR : globule rouge

GRB2 : growth factor receptor-bound protien 2

GTPase: guanosine triphosphatase

GWAS : études d'association génétique pangénomiques

GYPA : glycophorine A

H

HbA : hémoglobine adulte

HbF : hémoglobine fœtale

HSPC : hematopoietic stem and progenitor cell

I

ICAM-4 : intercellular adhesion molecule-4

iPSC : induced pluripotent stem cells

IgG : immunoglobulines de type G

IL : interleukine

IMDM: Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium

J

JAK : janus kinase

K

kb : kilo base

kDa : kilo Dalton

KLF 1: Kruppel-like factor 1

L

LisH : lissencephaly type 1 like homology

M

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MEP : megakaryocyte erythroid progenitor

MFI : mean fluorecence intensity

MGG : May Grünwald Giemsa

min : minute

M-MLV RT : transcriptase inverse du virus de la leucémie murine de Moloney

N

NC : nombre de copies

NCN : nombre de copies normalisé

NLS : séquence de localisation nucléaire

NP40 : noninet P40

P

PBS : tampon phosphate salin

PCR : réaction de polymérisation en chaine

PE : phycoérythrine

Pén/Strp : pénicilline/streptomycine

PHHF : persistance héréditaire d’hémoglobine fœtale

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PLC-γ : phospholipase C-γ

Pro-E : proérythroblaste

PTB : phosphotyrosine binding

Q

qPCR : PCR quantitative en temps réel

R

Ret : réticulocyte

RFI : relative fluorescence intensity

RT : transcription inverse

S

SCF : stem cell factor

sec : seconde

SH-2 : src homology 2

SSC : side scatter

STAT : signal transducer and activator of transcription

T

TA : température ambiante

TAL : transcription activator-like

TM : domaine transmembranaire

TPO : thrombopoiétine

V

VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1

VLA : very late antigen

Z

ZBP : zinc-binding protein

Introduction

L'hématopoïèse est un processus continu permettant le renouvellement des cellules sanguines (Figure 1). Les hématies, les plaquettes, les monocytes/macrophages, les polynucléaires (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) et les lymphocytes sont issus d'une seule et même cellule souche hématopoïétique (CSH) dite pluripotente. La CSH présente dans la moelle osseuse est une cellule indifférenciée capable d'auto-renouvèlement qui interagit avec les différents types cellulaires présents dans son environnement et qui peut se différencier sous l'influence de cytokines et de facteurs de transcription en interaction avec le microenvironnement médullaire. Ainsi, la CSH s'engage soit vers le compartiment myéloïde et devient un progéniteur pluripotent CFU-GEMM (*Colony Forming Unit Granulocyte-Erythrocyte-Macrophage-Megakaryocyte*), soit vers le compartiment lymphoïde et devient un progéniteur lymphoïde. Le progéniteur lymphoïde commun donne naissance aux progéniteurs B et T qui deviendront des lymphocytes B et T. Le progéniteur CFU-GEMM quant à lui évolue soit :

- en progéniteur MEP (*Megakaryocyte Erythroid Progenitor*) qui s'oriente ainsi vers la production d'érythrocytes (érythropoïèse) ou de plaquettes (thrombocytopoièse).
- en progéniteur granulo-macrophagique (GMP) pour produire les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles et les monocytes/macrophages.

Les progéniteurs évoluent en précurseurs engagés de manière irréversible vers une lignée particulière. Les précurseurs poursuivent leur différenciation pour devenir des cellules matures qui à terme quittent la moelle osseuse pour rejoindre la circulation sanguine (Figure 1).

Le plus haut rendement du système hématopoïétique est atteint au cours de l'érythropoïèse, avec un taux de production de 200 milliards de globules rouges (ou érythrocytes) par jour soit 2 millions de globules rouges par seconde. Les globules rouges sont des cellules anucléées de forme biconcave riches en hémoglobine (30 pg/cellule). Leur principale fonction est de véhiculer l'oxygène (O_2) et d'évacuer le dioxyde de carbone (CO_2) d'un organisme. La durée de vie d'un globule rouge est d'environ 120 jours ce qui implique une régulation fine et précise de l'érythropoïèse. Ainsi, en situation de stress (hémorragie

aigue, hémolyse ou manque d'oxygène), la production de globules rouges peut être multipliée par 8 afin de pallier aux besoins de l'organisme.

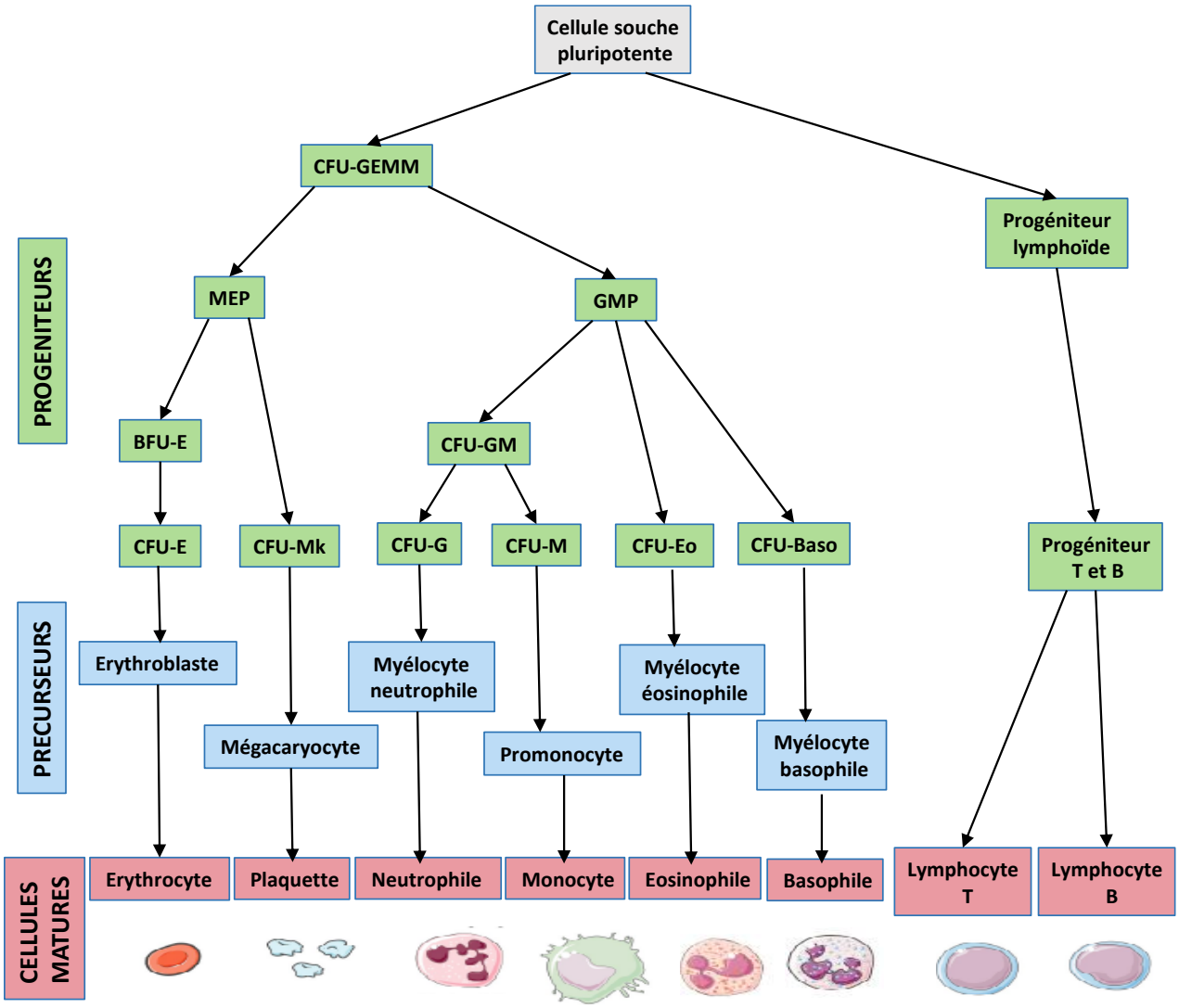


Figure 1 : L'hématopoïèse.
La cellule souche hématopoïétique donne naissance aux progéniteurs des lignées myéloïdes CFU-GEMM (colony forming unit granulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte) et lymphoïdes. Le progénieur lymphoide devient progéniteur B ou progéniteur T, puis lymphocyte B ou lymphocyte T. Le progéniteur myéloide se différencie en progéniteur MEP (Mégakaryocyte/Erythroid Progenitor) ou en GMP (Granulocyte/Monocyte Progenitor), puis en progéniteur engagé vers une lignée spécifique. On retrouve les BFU (burst forming unit-erythroid) puis les CFU-E (colony forming unit-erythroid), CFU-MK (colony forming unit-megakaryocyte), CFU-GM (colony forming unit-granulocyte-macrophage), CFU-M (colony forming unit-macrophage), CFU-G (colony forming unit-granulocyte), CFU-Eo (colony forming unit-eosinophil), CFU-Bas (colony forming unit-basophil). Les progéniteurs donnent naissance aux précurseurs qui se différencient en cellules matures.

1- L'érythropoïèse

1.1. Ontogénie et production d'hémoglobine

Le siège principal de l'érythropoïèse se modifie au cours du développement embryonnaire et, parallèlement, la nature des molécules d'hémoglobines exprimées varie également. L'hémoglobine est une molécule caractéristique des globules rouges. C'est une métalloprotéine contenant du fer qui se trouve à l'intérieur des hématies et est responsable de la couleur rouge du sang. L'hémoglobine a pour principale fonction de transporter les molécules d'oxygène vers les organes et les tissus grâce à la circulation sanguine. L'hémoglobine est un tétramère de chaines de globine et chaque unité globine est associée à un groupe hème, qui contient un atome de fer capable de s'associer à l'oxygène. En fonction des sous-unités présentes, on distingue les hémoglobines embryonnaire, fœtale et adulte (Figure 2). Les différentes chaines de globine sont codées par un cluster de gènes localisé sur le chromosome 11 (Bauer *et al.*, 2012).

Ainsi, au début de la vie embryonnaire, les premières hématies se forment dans les îlots sanguins du sac vitellin. Ces hématies contiennent de l'hémoglobine embryonnaire (chaines ξ et ε). Dans le deuxième mois de gestation, ces grandes cellules nucléées sont remplacées par des cellules plus petites provenant d'une hématopoïèse hépatique. Puis les mois suivant, le foie et la rate deviennent les principaux lieux de production érythrocytaire. Les hématies produites par le foie contiennent de l'hémoglobine fœtale (chaines α et γ). Ce n'est qu'à partir du cinquième mois que se développent les cavités des régions cartilagineuses centrales des os, dans lesquelles vont migrer les cellules du foie. La moelle osseuse devient alors le siège définitif de l'érythropoïèse.

L'hémoglobine fœtale est composée de deux sous unités α et deux sous unités γ. Comme son nom l'indique elle est exprimée au cours du développement fœtal mais également dans la période périnatale. Son expression disparait dans les premiers mois de vie et elle est alors remplacée par l'hémoglobine adulte, c'est ce qu'on appelle la commutation (switch) périnatale de l'hémoglobine. La persistance d'un taux l'hémoglobine fœtale supérieur à 1% chez l'adulte est associée à des pathologies comme certaines leucémies ou la persistance héréditaire d'hémoglobine fœtale (PHHF). On distingue deux formes d'hémoglobine adulte.

Environ 98 % de l'hémoglobine adulte d'un individu normal est de l'hémoglobine A1 composée de deux sous unités α et deux sous unités β, les 2% restants sont de l'hémoglobine A2 composée de deux sous unités α et deux sous unités δ (Bauer *et al.*, 2012).

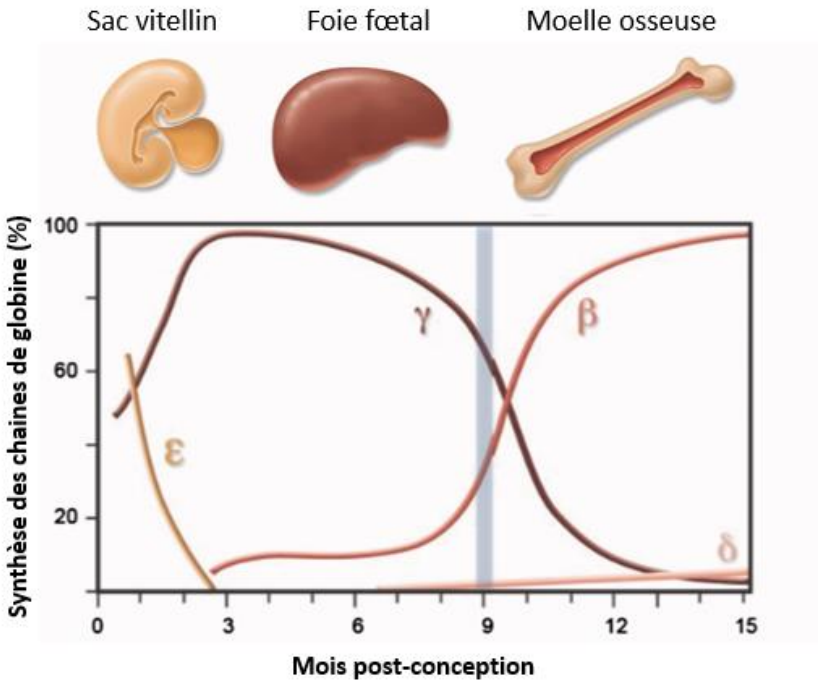


Figure 2 : Expression des chaines de globine au cours du développement.
Au cours du premier trimestre de la vie embryonnaire, l'hémoglobine embryonnaire (chaine ε) est exprimée dans les hématies produites dans le sac vitellin. L'hémoglobine embryonnaire est ensuite remplacée par l'hémoglobine fœtale (chaine γ) exprimée au cours de l'hématopoïèse hépatique. Enfin, dans les premiers mois de la vie l'hémoglobine fœtale est remplacée par l'hémoglobine adulte (chaine β et δ), c'est le switch périnatal de l'hémoglobine. (d'après Bauer *et al.*, 2012)

1.2. L'érythropoïèse précoce

Au cours de l'érythropoïèse précoce, la CSH médullaire restreint sa pluripotence et s'engage définitivement dans la voie de la lignée rouge aboutissant à l'apparition d'un progéniteur érythroïde unipotent.

La CSH, en réponse aux facteurs environnementaux, emprunte la voie myéloïde. Le premier stade de cette différenciation est la CFU-GEMM qui se différencie en progéniteur bipotent MEP (*Megakaryocyte Erythroid Progenitor*), puis en progéniteurs BFU-E (*Bust Forming Unit-Erythroid*), irréversiblement engagés vers la lignée érythroïde, et enfin en CFU-E (*Colony Forming Unit-Erythroid*), progéniteur le plus mature (Figure 3).

La caractérisation des cellules grâce à des marqueurs membranaires est complexe. La molécule CD34 (Cluster de Différenciation 34) est exprimée par la CSH et son expression est maintenue jusqu'au stade BFU-E. A partir du stade CFU-GEMM, le récepteur du *Stem Cell Factor* (SCF), également appelé c-kit ou CD117, est exprimé. Le récepteur de l'érythropoïétine (EPO-R) est quant à lui exprimé à partir du stade BFU-E et le récepteur de la transferrine (CD71) au stade CFU-E. A partir du stade CFU-E apparait également CD235a (glycophorine A, GYPA) marqueur de l'érythropoïèse tardive.

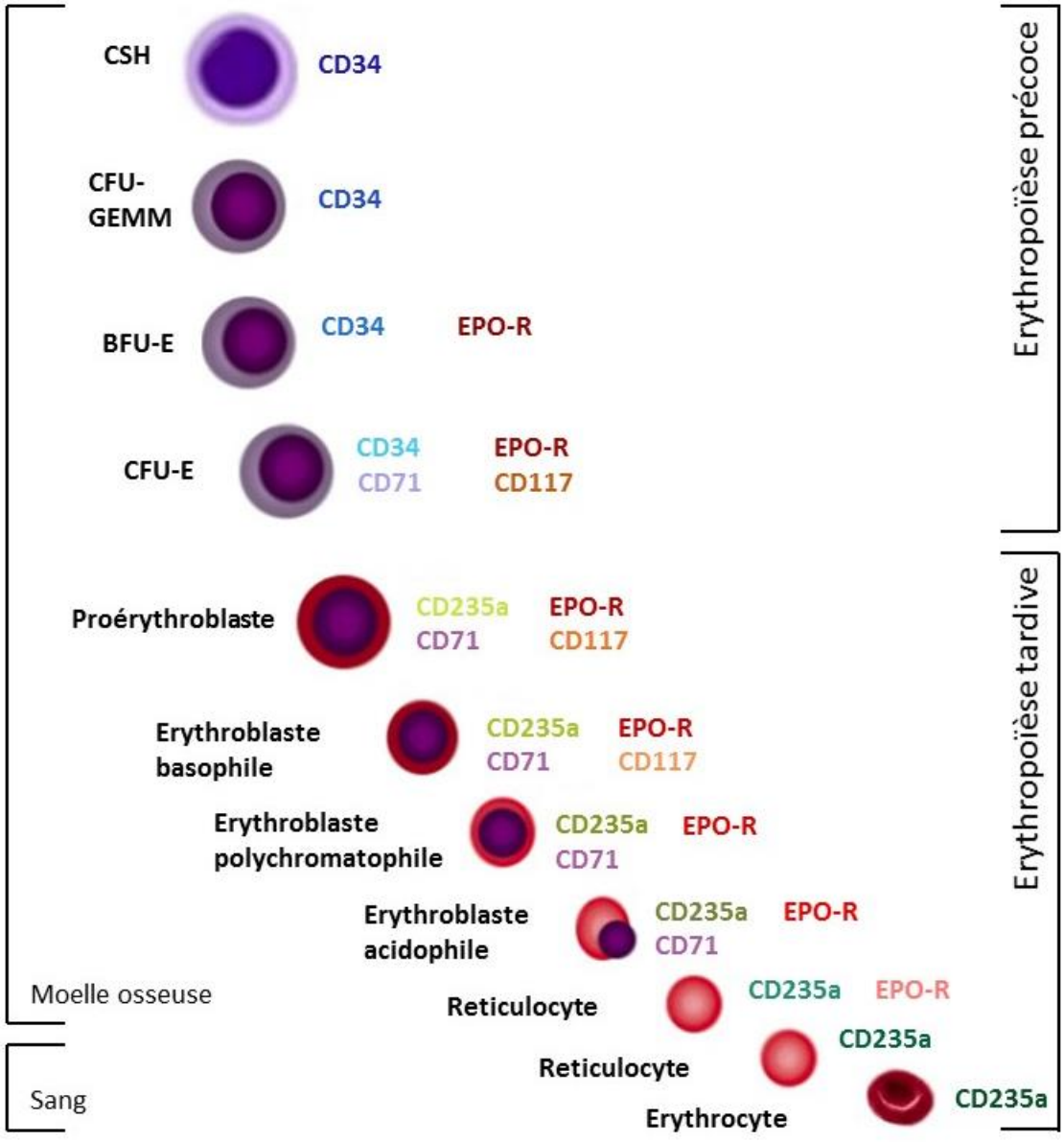


Figure 3 : L'érythropoïèse.
Les marqueurs les plus représentatifs exprimés lors des étapes de maturation érythroïde sont représentés. La variation de l'intensité des couleurs correspond aux niveaux d'expression de ces marqueurs (d'après Macri et al., 2015)

Comme les différents progéniteurs/précurseurs ne possèdent pas de caractères cytologiques propres qui permettraient leur identification par coloration de May Grünwald Giemsa (MGG), l'identification du nombre BFU-E et CFU-E s'effectue par la caractérisation de colonies en milieu semi-solide de type méthyl-cellulose en présence de cytokines. Ainsi les BFU-E forment de larges colonies contenant plus de 200 érythroblastes en 14 jours. Tandis que les CFU-E donnent naissance à de petites colonies d'érythroblastes en 7 jours.

Les CSH représentent environ 0,05% des cellules de la moelle osseuse et les BFU-E et CFU-E représentent chacune 0,3% des cellules médullaires.

1.3. L'érythropoïèse tardive

L'érythropoïèse tardive correspond à la phase de maturation terminale des progéniteurs sous la dépendance de l'érythropoïétine (EPO). Elle comprend un ensemble de modifications morphologiques et fonctionnelles aboutissant en 6 jours, à partir d'un CFU-E, à la production d'un globule rouge mature énucléé et biconcave. Ainsi, elle regroupe les stades proérythroblaste, érythroblaste basophile, tous deux dits immatures, et les stades érythroblaste polychromatophile, érythroblaste acidophile (ou orthochromatique) et réticulocyte, qui sont des stades matures. L'ensemble de ces cellules représente environ 25% des cellules nucléées médullaires.

Chez l'homme les différents stades cellulaires sont difficilement séparables phénotypiquement bien que le niveau d'expression d'un grand nombre de marqueurs varie (Tableau I) (Hu *et al.*, 2013) (Fajtova *et al*., 2013). Par exemple, l'expression de la GYPA est faible sur les pro-érythroblastes et forte à partir du stade érythroblaste basophile. Inversement la molécule d'adhérence CD49d (sous-unité α4 de l'intégrine VLA-4) présente une expression élevée dans les cellules immatures qui diminue au cours de la différenciation et est absente sur les réticulocytes.

Tableau I. Quelques exemples de marqueurs dont l'expression est régulée au cours de l'érythropoïèse tardive. - : absence d'expression ; + : expression faible ; ++ : expression intermédiaire ; et +++ : expression forte (Hu *et al*., 2013).

Marqueurs	Pro-érythroblaste	Erythroblaste basophile	Erythroblaste polychromatophile	Erythroblaste acidophile	Réticulocyte
GYPA	+	+++	+++	+++	+++
CD117	+++	+++	+	+	+
CD49d	+++	+++	++	+	-
Hémoglobine	-	+	+++	+++	+++

La classification des stades érythropoïétiques repose sur des critères observés en microscopie optique de frottis colorés au MGG : taille cellulaire, rapport nucléocytoplasmique, basophilie du cytoplasme et condensation de la chromatine au cours de la maturation. Ainsi au cours de la maturation le volume cellulaire diminue progressivement jusqu'à l'expulsion du noyau. Le cytoplasme des cellules immatures est basophile et devient progressivement acidophile en raison de la diminution du contenu cellulaire en acides ribonucléiques et de l'apparition de l'hémoglobine qui donne au cytoplasme cette affinité pour l'éosine (Figure 4).

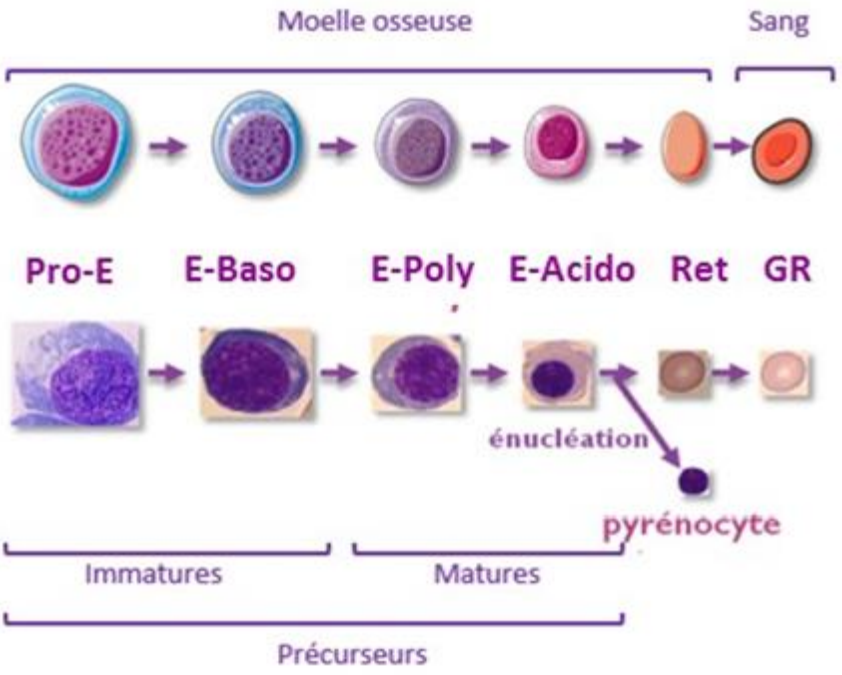


Figure 4 : Différents stades de l'érythropoïèse tardive.
Les précurseurs se différencient en proérythroblaste (Pro-E), érythroblaste basophile (E-Baso), érythroblaste polychromatiphile (E-Poly), érythroblaste acidophile (E-Acido), réticulocyte (Ret) et enfin en globule rouge (GR) (d'après la thèse de Diane d'Allard, 2013).

Le proérythroblaste

C'est une cellule de grande taille, arrondie, 26 µm de diamètre, au rapport nucléocytoplasmique élevé (environ 0,8). La chromatine est fine et tend à se regrouper en amas. On observe un ou deux nucléoles, le cytoplasme étant réduit à une mince couronne périnucléaire dont la basophilie « bleu de Prusse » est caractéristique. Le proérythroblaste est une cellule qui représente 0,5% des cellules médullaires.

L'érythroblaste basophile

C'est une cellule arrondie, bien limitée, de 16 à 18 µm de diamètre. Sa chromatine se condense en mottes fréquemment disposées en rayon. Le nucléole disparait, le cytoplasme reste très basophile. L'hémoglobine commence à être synthétisée. L'érythroblaste basophile représente 2 à 4 % des cellules médullaires.

L'érythroblaste polychromatophile

Cette cellule est caractérisée par l'accumulation progressive d'hémoglobine dans le cytoplasme qui perd sa basophilie. Sa taille est de 9 à 10 µm en raison de la réduction du volume nucléaire. La cellule est très ronde avec un noyau central avec une chromatine très dense en mottes toujours en forme de rayons de roue. Le cytoplasme s'éclaircit pour prendre une couleur violet clair. Ce sont les derniers érythroblastes capables de proliférer.

L'érythroblaste acidophile

Cette cellule est caractérisée par sa petite taille (entre 8 et 9 µm), par un noyau pycnotique et rond qui s'excentre progressivement, constitué de deux blocs de chromatine très compacte. Son cytoplasme apparait rose orangé clair. Il s'agit du dernier stade nucléé de la maturation érythroblastique.

Le réticulocyte

C'est une cellule anucléée, acidophile de forme irrégulière. Sa taille est d'environ 8 µm pour un volume d'une centaine de femto litres. Elle contient encore des ribosomes dessinant un réseau bien visible au bleu de Crésyl. Cette cellule quitte la moelle osseuse et passe dans le sang où après 2 à 3 jours de maturation elle donnera enfin un globule rouge.

L'érythrocyte

L'érythrocyte (hématie ou globule rouge) est une cellule anucléée ayant la forme d'un disque biconcave. De forme irrégulière, sa taille est d'environ 7,5 µm. Son cytoplasme est

acidophile. Aucune organelle n'est présente dans l'érythrocyte mature. L'hémoglobine représente un tiers de sa masse. Toute anomalie de taille ou de forme entraine une anémie. Les érythrocytes non conformes, ne pouvant se déformer pour passer dans la circulation sanguine sont éliminés par la rate.

1.4. L'îlot érythroblastique

L'érythropoïèse tardive se déroule au sein d'organisations cellulaires spécifiques appelées îlots érythroblastiques. Ces structures sont composées d'un macrophage central autour duquel sont organisées de 5 à 30 cellules érythroïdes à tous les stades de différenciation (Lee *et al*., 1988).

Les îlots érythroblastiques sont des unités fonctionnelles décrites pour la première fois en 1958 par l'hématologue Marcel Bessis. Ils sont présents dans la moelle osseuse, mais également dans le foie fœtal et la rate où ils assurent trois fonctions principales (Bessis, 1958):

- la régulation de la croissance des érythroblastes, de leur différenciation ainsi que de l'énucléation *via* des interactions cellules/cellules et des facteurs sécrétés ;
- l'épuration des déchets, notamment les noyaux expulsés des érythroblastes acidophiles ou abortifs en cas d'érythropoïèse inefficace ;
- la régulation de la mort cellulaire par apoptose des précurseurs érythroïdes et leur phagocytose qui permet de recycler le fer de l'hémoglobine contenue dans les érythroblastes âgés ou sénescents.

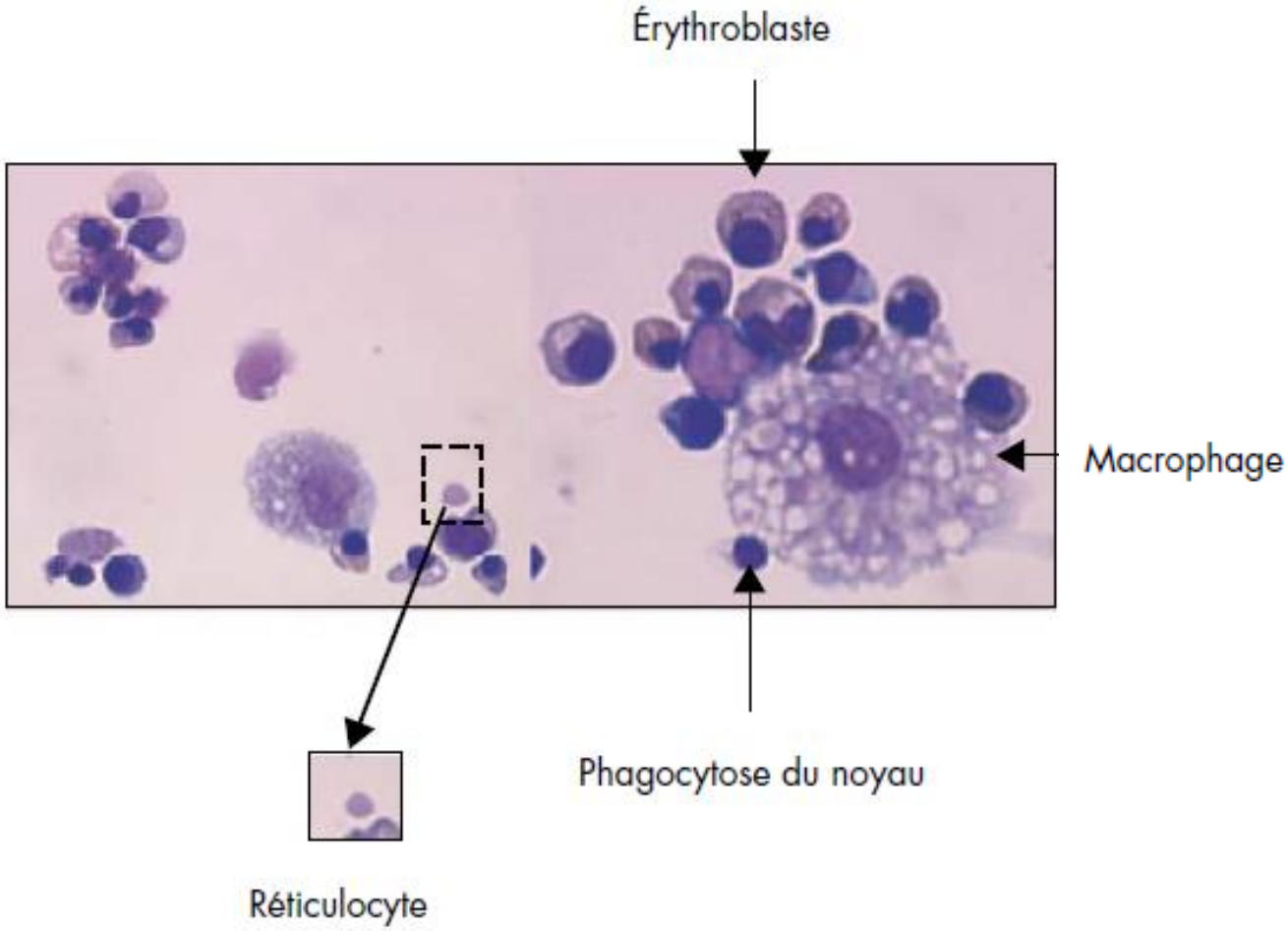


Figure 5 : Îlot érythroblastique
Le macrophage permet l'énucléation de l'érythrocyte. Le noyau expulsé est ensuite phagocyté par le macrophage ***(****Courtois et al., 2007)*

Le macrophage central est un macrophage résident de la moelle osseuse exprimant entre autre les marqueurs CD169, CD51 et VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*, CD106) (Chow *et al*., 2011). Il envoie des pseudopodes cytoplasmiques qui entrent en contact étroit avec les érythroblastes. La nature de l'interaction entre macrophage et érythroblastes est une adhésion qui implique plusieurs molécules (Jacobsen *et al.*, 2015). La protéine EMP/MAEA (*Erythroblast Macrophage Protein/Macrophage Erythroblast Attacher*), *via* une interaction homophilique, joue un rôle majeur dans la formation des îlots érythroblastiques. Les érythroblastes expriment également l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (également appelée VLA-4 pour *Very Late Antigen-4)* un dimère composé d'une molécule CD49d (alpha 4) et d'une molécule CD29 (beta 1). Cette intégrine interagit avec VCAM-1 exprimée par le macrophage. De la même

manière l'intégrine α5 (VLA-5 ou CD49e) portée par les érythroblastes lie la protéine ICAM-4 (*InterCellular Adhesion Molecule-4* ou CD242) du macrophage (Chasis et Mohandas, 2008).

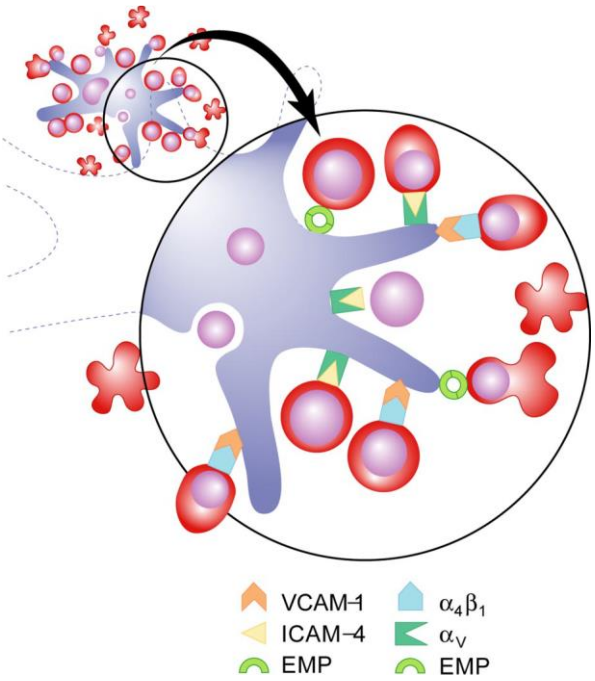


Figure 6 : Principales molécules impliquées dans l'interaction érythroblastes/macrophages au sein de l'îlot érythroblastique (Chasis, 2006). Le macrophage est représenté en violet, les érythroblastes et les réticulocytes en rouge, et les noyaux en parme. Les molécules d'interaction sont également représentées.

Chez l'homme, la dernière étape de l'érythropoïèse est l'énucléation qui donne naissance au stade réticulocyte. Ce processus dynamique se déroule lui aussi au sein de l'îlot érythroblastique. Dans un premier temps l'érythroblaste acidophile se polarise et son noyau migre à la périphérie de la cellule, puis un bourgeonnement de la membrane se produit. Le noyau reste entouré par une membrane plasmique intacte et est relié au réticulocyte par une fine extension membranaire. A cette étape, la composition de la membrane plasmique change et la distribution des protéines membranaires est modifiée (Bell *et al.*, 2013; Gautier *et al.*, 2016). Ainsi, l'érythroblaste perd progressivement son affinité pour le macrophage alors que le noyau reste fixé (Figure 7). Le noyau extrudé expose rapidement à sa surface des phosphatidylsérines qui constituent un signal de phagocytose par les macrophages (Yoshida *et al.*, 2005).

L'énucléation est étroitement régulée. Par exemple, la polarisation de la cellule est PI3K-dépendante (*Phosphoinositide 3-kinase*) et s'accompagne de la réorganisation des filaments d'actine (Konstantinidis *et al.*, 2012). La migration du noyau implique les myosines

non musculaires, les dynéines (Kobayashi *et al.*, 2016) et la GTPase RAC est nécessaire à la formation de l'anneau contractile (Ji *et al*., 2008).

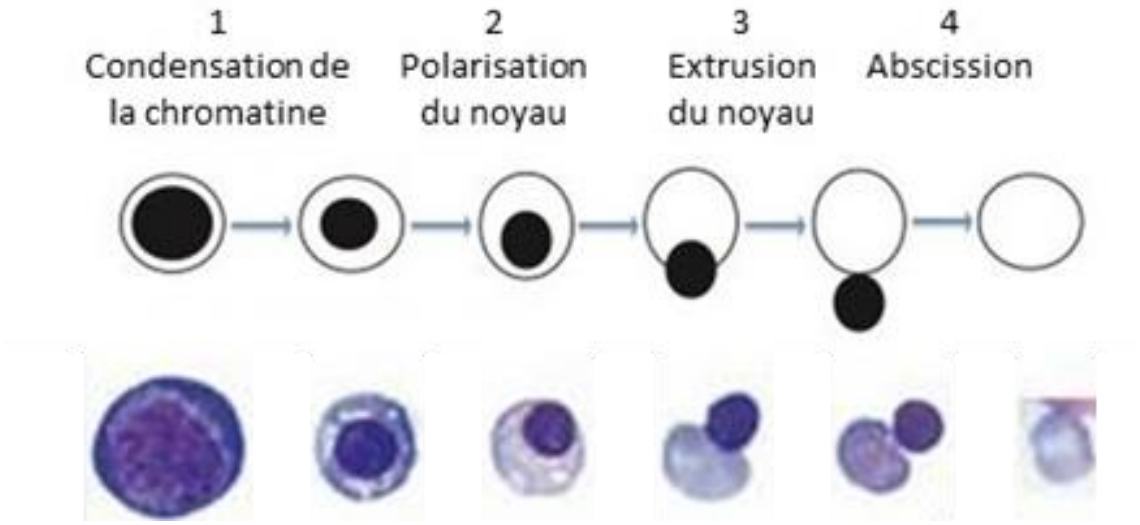


Figure 7 : Différentes étapes de l'énucléation : de la condensation de la chromatine à l'extrusion du noyau (d'après Thom et al 2014)

Après l'énucléation, le réticulocyte va compléter sa maturation avant de passer dans la circulation sanguine. Sur une période de quelques jours il perd progressivement la réticuline, ses vacuoles, remodèle sa bicouche lipidique et change de forme. Le réticulocyte va tendre vers une forme biconcave, acquérir une plasticité et une déformabilité accrues associées à une taille réduite (6-7µm) lui permettant un déplacement dans la microcirculation des tissus et organes.

1.5. Régulation de l'érytropoïèse

L'érythropoïèse est régulée par les effets combinés du microenvironnement, notamment l'îlot éryhtroblastique ; les facteurs de croissance impliqués dans la survie, la prolifération et la différenciation des progéniteurs ; et les facteurs de transcription qui régulent l'établissement du phénotype érythroïde.

Facteurs de croissance et cytokines

De nombreux facteurs de croissances et cytokines sont impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse. La TPO (thrombopoiétine), les interleukines-3, -6, -8, -9, -11, le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*) régulent les progéniteurs précoces en augmentant le nombre de BFU-E (Birkmann *et al.*, 1997). Cependant aucun de ces facteurs n'est critique pour le développement *in vivo*. Seuls le Stem Cell Factor (SCF) et l'érythropoïétine (EPO) sont absolument indispensables. Ainsi, des études réalisées chez la souris ont montré que la mutation du SCF ou de son récepteur induit une anémie sévère (Wu *et al.*, 1995). Par ailleurs, l'invalidation des gènes codant pour l'EPO ou son récepteur chez la souris provoque une anémie létale au stade fœtal.

Le Stem Cell Factor (SCF) est synthétisé par les cellules stromales de la moelle osseuse. Il existe sous deux formes, l'une soluble et l'autre transmembranaire. La forme transmembranaire semble particulièrement importante pour la régulation de l'érythropoïèse car les souris n'exprimant que la forme soluble sont anémiques. Le SCF agit sur son récepteur CD117/c-kit et induit des signaux intracellulaires essentiellement de survie et de prolifération sur les progéniteurs érythroïdes. Il agit en synergie avec d'autres facteurs notamment avec le GM-CSF et l'interleukine-3. Le SCF augmente également la sensibilité des CFU-E à l'érythropoïétine.

L'érythropoïétine (EPO) est la seule cytokine régulatrice de l'érythropoïèse tardive, l'EPO est produite par le rein et agit au niveau de la moelle osseuse pour stimuler la production de globules rouges. En retour, l'oxygène apporté aux cellules rénales va diminuer la synthèse d'EPO ce qui aura pour conséquence la diminution de la production de globules rouges. Physiologiquement, il y a une parfaite corrélation entre le taux d'hémoglobine et le taux d'érythropoïétine.

Plusieurs voies de transmission du signal sont activées par la liaison de l'EPO à son récepteur (Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/Akt, voie calcique). La principale est la voie JAK/STAT. En se fixant sur son récepteur, l'EPO recrute la protéine JAK2 (*Janus Kinase 2*), une tyrosine kinase. JAK2 active le récepteur par phosphorylation ce qui permet le recrutement de protéines de la famille STAT (*Signal*

Transducer and Activator of Transcription). La phosphorylation de STAT5 entraine son hétérodimérisation (STAT5a/STAT5b), puis la migration de l'hétéroduplex dans le noyau pour réguler l'expression des gènes cible. STAT5 agit en synergie avec GATA-1 pour augmenter l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL (Dolznig *et al*., 2002). Les voies activées par l'EPO permettent la prolifération et la survie cellulaire.

Principaux facteurs de transcription

Plusieurs facteurs de transcriptions sont impliqués tout au long de la maturation érythroïde. Par exemple, les gènes des globines sont régulés par les facteurs GATA-1, KLF-1, p45NF-E2 et ZBP-89. L'expression de la GYPA est régulée par TAL-1 et GATA-1.

Les facteurs GATA-1 et GATA-2 jouent un rôle central dans la différenciation érythroïde. Cette famille, caractérisée par la présence de deux motifs à doigt de zinc conservés, comprend six membres. GATA-1, -2 et -3 sont abondamment exprimés dans les tissus hématopoïétiques mais seuls GATA-1 et GATA-2 sont impliqués dans l'érythropoïèse. GATA-1 est indispensable au bon déroulement des phases tardives de l'érythropoïèse en activant la transcription des gènes codant la GYPA, les chaines de l'hémoglobine, l'EPO-R ainsi que le gène de survie *Bcl-xL*. En son absence la production de globules rouges est impossible (Pevny *et al*., 1991) (Weiss *et al*., 1994).

L'expression de GATA-1 et GATA-2 est séquentielle. Ainsi, GATA-2 est exprimé précocement puis diminue de façon concomitante à l'augmentation de GATA-1. Au niveau moléculaire GATA-2 inhibe la transcription du gène GATA-1, et réciproquement *(*Leonard *et al*., 1993) (Mouthon *et al*., 1993) (Ohneda and Yamamoto, 2002) (Nagai *et al*., 1994). Ainsi, l'hypothèse du « swich GATA » pourrait expliquer l'engagement d'une cellule multipotente dans la lignée érythroïde. Une expression stochastique de GATA-1 au sein de certaines cellules immatures permet la répression de GATA-2, l'arrêt de la prolifération cellulaire et l'engagement des cellules dans la maturation érythroïde (Bresbick *et al*. 2005).

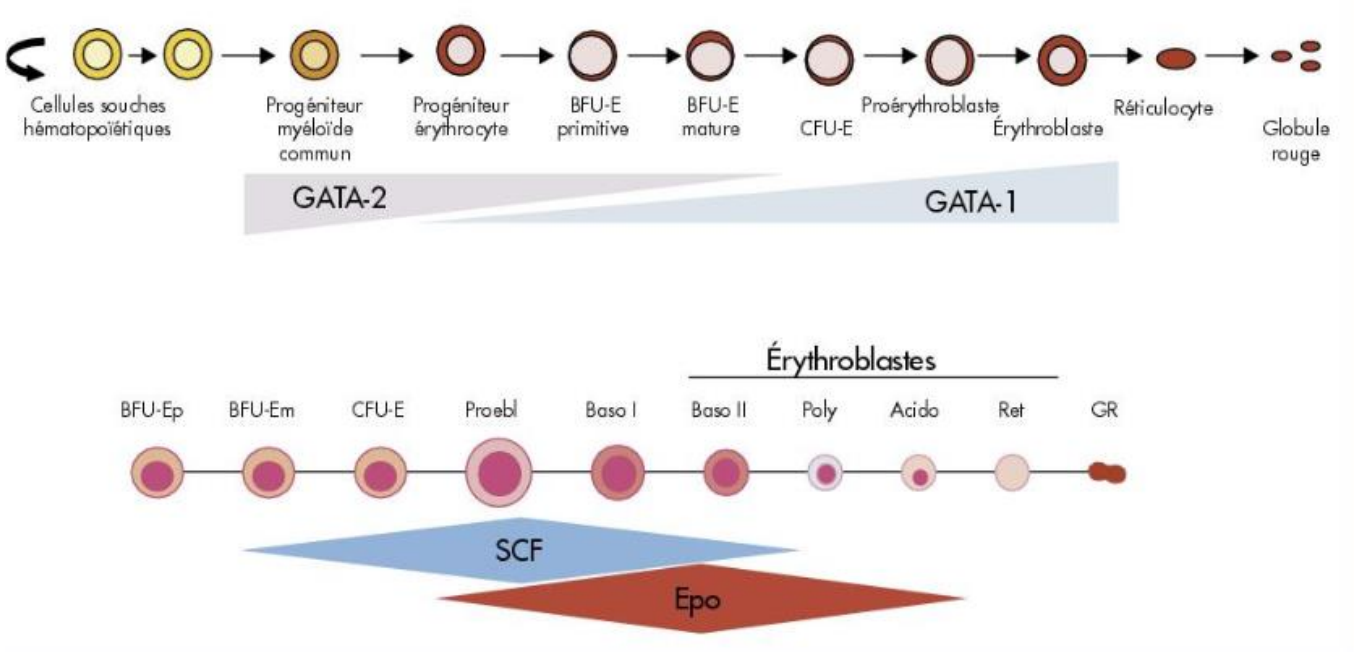


Figure 8 : Facteurs régulant l'érythropoïèse.
Les différents précurseurs érythroïdes sont dépendants de l'Epo à partir du stade BFU-E mature (BFU-Em). Les facteurs de transcription GATA-2 et GATA-1 sont exprimés de façon séquentielle. Proebl : proérythroblaste ; Baso : érythroblaste basophile ; Poly : érythroblaste polychromatophile ; Acido : érythroblaste acidophile ; Ret : réticulocyte ; GR : globule rouge. (Hématologie 2007 ; 13[6] :400-8)

2- La protéine Emp/MAEA (Erythroblast Macrophage Protein/Macrophage Erythroblast Attacher)

2.1 Du gène à la protéine

La protéine Emp/MAEA, composée de 395 acides aminés (aa) pour un poids moléculaire calculé de 43 kDa. Dans le macrophage, la protéine Emp/MAEA est présente sous deux isoformes qui diffèrent par leur partie N-terminale.

Le gène qui code Emp/MAEA est situé sur le bras court du chromosome 4 en p16.3. Il couvre plus de 50 kb et est composé de 9 exons. Le transcrit qui compte environ 2kb a été détecté dans différents tissus (cœur, cerveau, placenta, poumon, foie, muscle squeletique, pancréas, rein) (Hanspal *et al*., 1998). Le gène est très conservé au cours de l'évolution et la protéine Emp/MAEA est une protéine ubiquitaire. L'extinction du gène chez la souris conduit à une mort périnatale des embryons (Soni *et al*., 2006). Les analyses *in silico* ont permis de mettre en évidence plusieurs domaines fonctionnels (Figure 9):

- un domaine transmembranaire (TM) putatif entre les acides aminés 56 et 80 (bien que la protéine soit dépourvue de peptide signal)
- une séquence de localisation nucléaire NLS (*Nuclear Localization Sequence*) composée de 4 aa basiques (Lys^{110}-Arg^{111}-Lys^{112}-Arg^{113})
- un motif LisH (*Lissencephaly type 1 like Homology*) qui contribue à la régulation de la dynamique des microtubules
- un domaine CTLH (*C-terminal LisH motif*) qui est un domaine d'interaction protéine/protéine qui couple les récepteurs membranaires aux voies de signalisation intracellulaires
- plusieurs sites potentiels de phosphorylation sur tyrosine (Tyr^{127} et Tyr^{312}) susceptibles de lier les domaines SH-2 de la phospholipase C-γ (PLCγ) ou de GRB2 (*Growth factor Receptor-Bound protien 2*) et une séquence de 4 acides aminés (Asn-Asp-Lys-Tyr) de l'aa 391 à 394 correspondant au site PTB (*Phosphotyrosine binding*). Ces observations suggèrent que la protéine pourrait avoir un rôle dans la signalisation.

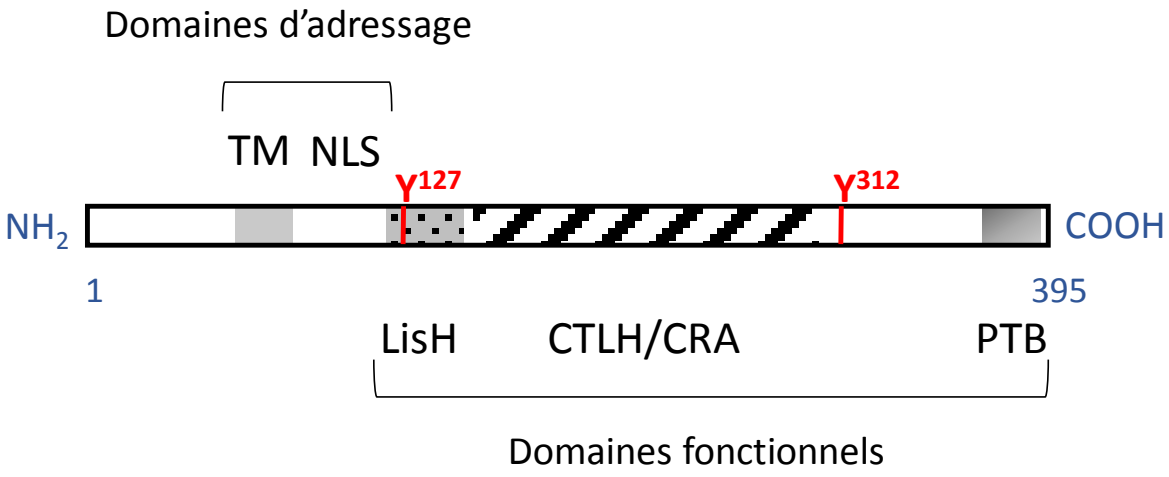


Figure 9 : Domaines fonctionnels de la protéine Emp/MAEA.
TM : Transmembranaire ; NLS : séquence de localisation nucléaire ; LisH : domaine homologie de Lis ; CTLH : partie C-Terminale de LisH ; PTB : Phosphotyrosine Binding. Y^{127} *et* Y^{312} *: Sites potentiels de phosphorylation sur tyrosine*

La présence de ces différents domaines fonctionnels putatifs suggère de multiples fonctions. La protéine est essentiellement présente dans la matrice nucléaire associée à l'actine, mais une expression membranaire a été décrite dans les érythroblastes et les macrophages aussi bien murins qu'humains. La forme transmembranaire possède une courte extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale cytoplasmique.

2.2 Rôle dans l'hématopoïèse

La protéine Emp/MAEA a été initialement décrite comme la première molécule qui permet l'adhésion du macrophage et des érythroblastes au sein de l'îlot érythroblastique. Cette adhésion est calcium indépendante et est inhibée par l'héparine. L'Emp/MAEA est exprimée à la surface du macrophage et des érythroblastes et est impliquée non seulement dans les interactions érythroblastes/macrophage mais également dans les interactions érythroblastes/érythroblastes (Hanspal and Hanspal, 1994). Les interactions impliquant Emp/MAEA sont de type homophilique qui mettent en jeu l'extrémité amino-terminale extracellulaire de la protéine (Hanspal *et al*., 1998).

Ainsi, Emp/MAEA est impliquée dans la différenciation du macrophage et joue un rôle dans érythropoièse.

Différenciation du macrophage

Les études réalisées *in vitro* sur des macrophages de foie fœtal de souris, ont montré que la localisation sub-cellulaire d'Emp/MAEA est modifiée au cours de la différenciation (Bala *et al*., 2006; Soni *et al*., 2006). Dans les cellules immatures, la protéine est majoritairement associée à la matrice nucléaire et seulement 5% est localisé à la membrane. Dans les cellules matures 60 à 70% de la protéine est adressée à la membrane, essentiellement le long des pseudopodes. Cette redistribution d'Emp/MAEA est cohérente avec son rôle dans la formation des îlots érythroblastiques qui impliquent des macrophages matures. Par ailleurs elle suggère un rôle d'Emp/MAEA dans la différenciation des macrophages. Ceci a été confirmé par les études *in vivo* chez la souris. En effet, au niveau morphologique les embryons murins déficients pour le gène codant la protéine Emp/MAEA présentent des macrophages

peu matures, petits et ronds avec un faible nombre de pseudopodes. L'absence d'Emp/MAEA est associée à des filaments d'actine plus condensés et moins organisés dans les macrophages, ce qui empêche le développement des extensions cytoplasmiques nécessaires à l'intégrité de l'îlot érythroblastique (Bala *et al*., 2006; Soni *et al*., 2006). Ces défauts morphologiques sont d'ailleurs accompagnés d'une absence d'îlots érythroblastiques (Bala *et al*., 2006). La présence d'Emp/MAEA à la surface de la cellule est cohérente avec son rôle dans la formation d'îlots érythroblastiques, alors que sa présence dans la matrice nucléaire pourrait expliquer sa fonction dans la croissance et la différenciation des monocytes et des macrophages (Soni *et al*., 2007).

Dernièrement, il a été rapporté que l'Emp/MAEA est aussi impliquée dans la migration des macrophages (Javan *et al.*, 2016). La diminution d'expression d'Emp/MAEA dans les cellules de la lignée RAW 264-7 (monocytes/macrophages murins) est associée à une diminution significative de la motilité des macrophages. Les auteurs suggèrent que l'Emp/MAEA pourrait faire partie d'un complexe impliquant l'actine du cytosquelette et les adhésomes (complexes protéiques associés aux intégrines et voies de signalisation) et pourrait également avoir un rôle dans les phénomènes métastatiques (Javan *et al*., 2016).

Rôle dans l'érythropoïèse

Des études de co-cultures de cellules murines ont permis de révéler que l'Emp/MAEA est indispensable à la maturation des érythroblastes (Hanspal *et al*., 1998). En effet, la co-culture des érythroblastes avec des macrophages réduit significativement l'apoptose des érythroblastes. Lorsqu'un anticorps dirigé contre l'extrémité N-terminale d'Emp/MAEA est ajouté à la co-culture, il réverse cet effet protecteur. Une diminution drastique de la prolifération, de la maturation et de l'énucléation des cellules érythroïdes est également observée. Chez la souris, l'absence d'Emp/MAEA entraîne une splénomégalie, une anémie sévère, un défaut de maturation des macrophages et des érythrocytes, des taux d'hématocrite et d'hémoglobine faibles, ainsi qu'un défaut d'énucléation (Soni *et al*., 2006) (Soni *et al*., 2008). L'invalidation du gène *Emp* a également mis en évidence que l'Emp/MAEA est indispensable pour l'énucléation. En effet, les fœtus murins Emp-/- ont un nombre important d'érythrocytes immatures nucléés circulants. *In vitro* les érythroblastes de fœtus Emp-/- ne lient pas les macrophages Emp-/- mais peuvent toutefois lier les macrophages sauvages ce qui

suggère une interaction hétérophilique entre l'Emp/MAEA exprimée par le macrophage et une protéine de l'érythroblaste. Malgré leur interaction avec les macrophages Emp+/+, les érythroblastes Emp-/- restent incapables d'énucléer (Soni *et al*., 2006).

L'Emp/MAEA est également impliquée dans la distribution de l'actine dans les érythroblastes. Dans les érythroblastes de souris sauvages l'actine est localisée à la membrane plasmique et au sein de faisceaux dispersés dans le cytosol et l'Emp/MAEA co-localise avec la F-actine au sein des faisceaux d'actine. Par contre dans les érythroblastes Emp-/- aucun faisceau d'actine n'est détecté dans le cytosol et seule la localisation membranaire de l'actine est conservée (Soni *et al*., 2006).

Au cours de l'énucléation, l'Emp co-localise avec la F-actine dans l'anneau contractile, puis, au moment de l'expulsion du noyau, l'actine « reste » dans le réticulocyte alors que l'Emp/MAEA ségrége majoritairement avec le pyrénocyte (Bell *et al*., 2013; Hanspal *et al*., 1998).

Donc, en plus d'être impliquée dans l'expulsion nucléaire, l'association Emp-actine agit potentiellement dans la régulation du cytosquelette dans les réticulocytes (Bala *et al*., 2006).

2.3 Etudes dans les cellules non hématopoïétiques

La protéine Emp/MAEA a été initialement détectée dans les îlots érythroblastiques mais son expression ubiquitaire, la présence dans sa séquence primaire d'une séquence NLS d'adressage nucléaire, ainsi que son homologie avec Gid9 suggèrent des fonctions non limitées à l'hématopoïèse.

Réarrangements de la protéine nucléaire

La protéine Emp/MAEA est détectée dans le noyau des cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques. Si on peut penser que cette localisation est liée à son rôle dans l'énucléation des érythroblastes, il n'en est rien dans les autres types cellulaires qui n'expulsent pas leur noyau. Partant de ce constat, une étude visant à préciser le rôle d'Emp/MAEA dans le noyau a été réalisée sur des cellules HEK (cellules humaines embryonnaires de rein) transfectées avec le ADNc codant pour Emp/MAEA (Bala *et al*., 2006).

Dans ce modèle cellulaire, environ 80% de l'Emp/MAEA total est présent dans la fraction nucléaire. La protéine est présente principalement dans la matrice nucléaire où elle co-localise partiellement avec l'actine et avec le facteur de transcription SC35. Des tests de co-immunoprécipitation ont confirmé l'étroite association entre la protéine Emp/MAEA et l'actine nucléaire. Ces observations ont été confirmées sur les cellules U937 (lignée humaine de type monocyte) qui contrairement aux cellules HEK ont un niveau élevé d'expression endogène de Emp/MAEA. Les auteurs se sont ensuite intéressés à la localisation d'Emp/MAEA au cours de la mitose dans des cellules synchronisées. Emp/MAEA subit des réarrangements dynamiques au cours de la mitose et migre au niveau des fuseaux mitotiques, ainsi que dans l'anneau contractile.

Ainsi, Emp/MAEA pourrait participer à l'architecture nucléaire voire à la division cellulaire chez les mammifères (Bala *et al*., 2006).

Implication dans le complexe CTLH

Emp/MAEA est également l'une des huit protéines formant le complexe muskeline/RanBP9/CTLH. Ce complexe régule le turnover des protéines eucaryotes grâce à son activité ubiquitine E3 ligase (plus de 600 E3 ligases sont connues chez l'homme). Les études phylogénétiques ont d'ailleurs montré que l'Emp/MAEA est orthologue de GID9 de *S. Cerevisiae*, une des protéines du complexe GID (*glucose induced degradation deficient*) qui régule la polyubiquitination de la FBPase (fructose 1,6-biphosphatase) une enzyme impliquée dans la néoglucogénèse (Francis *et al*., 2013). En accord avec ces données, les études d'association génétique pangénomiques (*genome- wide association study, GWAS*) ont identifié Emp/MAEA comme un gène de susceptibilité au diabète de type 2 dans les populations de l'Est asiatique (Cho *et al*., 2011; Imamura *et al*., 2012).

Le domaine LisH (*Lissencephaly type 1 like Homology)* de la muskeline est décrit comme un motif de régulation de la localisation nucléaire de cette protéine (Adams, 2002). Il pourrait en être de même pour Emp/MAEA qui possède un domaine similaire dans sa région centrale (Francis *et al*., 2013).

Par ailleurs, les domaines CTLH et LiSH sont présents dans des protéines impliquées dans la dynamique des microtubules, la migration cellulaire ou encore la ségrégation des chromosomes, autant de fonctions dans lesquelles Emp/MAEA pourrait jouer un rôle.

Objectifs

Aujourd'hui, la production de globules rouges *ex vivo* peut être considérée comme un objectif de société pour surmonter les difficultés d'approvisionnement qualitatif et quantitatif en sang qui apparaissent avec l'accroissement de la diversité, la répartition, la mixité, l'émergence de pathologies consommatrices de produits sanguins comme la drépanocytose. Mais jusqu'à présent les données de la littérature ne font état d'aucune condition *ex vivo* qui permette d'associer une prolifération, une différenciation et une énucléation massive de la totalité des érythroblastes avec une efficacité proche de celle observée *in vivo*.

Les études réalisées dans des modèles murins ont montré que la protéine Emp/MAEA est indispensable à la maturation des macrophages et des érythroblastes, à la formation des îlots érythroblastiques et à l'énucléation. Malgré l'importance de cette protéine au cours de l'érythopoïèse chez la souris, aucune étude *in vitro* n'a été réalisée chez l'homme et l'expression d'Emp/MAEA, sa régulation et sa distribution dans les érythroblastes humains demeurent inconnues. Dans ce contexte et afin d'appréhender une étape clef de l'érythropoïèse terminale humaine, à savoir l'énucléation, nous nous proposons d'étudier cette protéine.

Ce projet porte donc sur l'étude de l'expression d'Emp/MAEA à travers un modèle *in vitro* de culture et de différenciation des précurseurs érythroïdes humains isolés du sang de cordon. Pour ce travail, la première étape a été de mettre en place au sein de notre laboratoire un modèle de différenciation érythroïde *in vitro* de cellules humaines $CD34^+$ et de valider le modèle. Dans un second temps j'ai analysé l'expression d'Emp/MAEA au cours de la différenciation dans notre modèle. J'ai mesuré l'expression du transcrit et la protéine totale et nous sommes ensuite attachés à démontrer la localisation membranaire de la protéine.

Matériels et méthodes

1- Culture en milieu liquide des cellules CD34$^+$ humaines issues de sang de cordon

Les cellules humaines CD34$^+$ sont issues d'un pool de sang de cordon et conditionnées dans des ampoules de 1x10^6 cellules (Stemcell, Vancouver, Canada). La culture se déroule en deux temps : le premier est une phase de prolifération pendant 6 jours en présence de Stem Cell Factor humain recombinant (rh-SCF, Miltenyi Biotech, Gladbach, Allemagne) et d'interleukin-3 et 6 humaines recombinantes (rh-IL-3, rh-IL-6, Miltenyi Biotech) et le second une phase de différenciation en présence d'érythropoïétine humaine recombinante (rh-EPO, Stemcell), de rh-SCF et d'IL-3 pendant 11 jours.

Après décongélation rapide à 37°C, la suspension cellulaire CD34$^+$ est lavée deux fois avec de l'Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM contenant de la L-glutamine et 25 mM d'Hepes, Gibco BRL, Eragny, France), complémenté avec 15 % de substitut de sérum BIT-9500 (contenant de l'albumine sérique bovine, de l'insuline et de la transferrine, Stemcel) et 1% de Pénicilline/Streptomycine (Pén/Strp, Gibco BRL) préchauffé à 37°C. Après centrifugation 10 min à température ambiante (TA) à 300g, les cellules sont numérées en présence de 0,2% de bleu de trypan (Gibco BRL), et sont ensemencées dans des flacons de culture T-25 à une concentration de 1,2x10^5 cellules/ml dans le milieu de culture additionné de 10 ng/ml de rh-IL-3, 100 ng/ml de rh-IL-6 et de 100 ng/ml de rh-SCF. Les cellules sont cultivées pendant 6 jours à 37°C dans une atmosphère saturée en eau en présence de 5% de CO_2. A partir du jour 6 (J+6) les cellules sont maintenues à une concentration de 2x10^5 cellules/ml (8x10^4 cellules/cm^2) dans des flacons T-25 contenant du milieu de culture supplémenté avec 10 ng/ml de rh-IL3, 100 ng/ml de rh-SCF et 2 U/ml de rh-EPO.

Des préparations cellulaires en couches minces par cytocentrifugeuse suivies d'une coloration au MGG et des analyses de cytométrie en flux sont réalisées à différents temps de la culture (J+6, J+8, J+10, J+13, J+15, J+17).

2- Coloration May Grünwald Giemsa (MGG)

La coloration de MGG est une méthode de coloration utilisée en hématologie pour différencier et compter les différentes populations de cellules sanguines dans des préparations cellulaires.

- Le colorant selon May-Grünwald (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) est composé d'un colorant acide, l'éosine, et d'un colorant basique, le bleu de méthylène. Il induit une coloration orthochromatique des éléments cellulaires auxquels il se fixe (couleur rose ou orange due à l'éosine pour les éléments acidophiles et couleur bleu ou violet due au bleu de méthylène pour les éléments basophiles et neutrophiles).
- Le colorant selon Giemsa (Sigma) est constitué d'éosine et d'azur de méthylène basique, qui est métachromatique induisant une couleur rouge pour les éléments azurophiles.

A différents temps de culture, de J+6 à J+17, $1x10^5$ cellules sont collectées pour la préparation par centrifugation de mince couche cellulaire à l'aide d'une nacelle EZ Single Cytofunnel munie d'une lame de verre coatée et dans une centrifugeuse Shandon Cytospin 4 pendant 3 min à 400 rpm (Cytospin). Après fixation des cellules au méthanol pur pendant 3 min, les lames sont plongées successivement pendant 3 min dans une solution de May Grünwald pure puis 3 min dans une solution de May Grünwald diluée au ½ dans du tampon phosphate 6,7 mM à pH 6,8 et enfin dans une solution de Giemsa diluée au 1/10 dans ce même tampon. Après un lavage rapide dans le tampon phosphate, les lames sont séchées à l'air libre et stockées à l'abri de la lumière.

L'observation et le comptage des cellules sont réalisés sous microscope optique en utilisant un objectif x100 à immersion. L'identification des stades de différenciation des cellules est réalisée sur une centaine de cellules, par un hématologue.

3- Analyse en cytométrie en flux

Les analyses sont réalisées à l'aide d'un cytomètre de flux MacsQUANT^{TM} VYB Analyzer (Miltenyi Biotech). Ce type d'appareil permet de mesurer la fluorescence émise par des cellules exprimant des antigènes réagissant soit avec un anticorps spécifique couplé à un fluorochrome (marquage direct) soit avec un anticorps spécifique non marqué révélé *via* l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome et dirigé contre le fragment constant (Fc) de l'anticorps spécifique (marquage indirect). L'analyse de ces signaux permet d'obtenir les caractéristiques individuelles de chaque cellule telles que la taille (FSC, *Forward SCatter*), la granulosité (SSC, *Side SCatter*) et l'intensité de fluorescence exprimée en MFI (*Mean Fluorecence Intensity*). Ainsi, la cytométrie en flux permet de déterminer

quantitativement l'expression de protéines membranaires comme par exemple la glycophorine A (GYPA), marqueur par excellence de la lignée érythroïde, ou des protéines intracellulaires comme l'hémoglobine fœtale (HbF).

Le logiciel FlowJo (version 10.2) permet l'analyse des données et représente les résultats sous forme de graphes représentant le nombre de cellules émettant une intensité de fluorescence donnée. La moyenne géométrique calculée pour chaque pic caractérise la réactivité antigénique de la population cellulaire analysée. Dans notre contexte, il est possible d'évaluer le pourcentage d'énucléation par l'utilisation d'une sonde fluorescente DRAQ5™ (Thermo Scientific, Villebon, France), un intercalant fluorescent de l'ADN, excitable à 647 nm, qui marque les noyaux des cellules.

Chaque marquage est réalisé sur $5x10^5$ cellules. Les cellules sont lavées une fois en PBS puis centrifugées 5 min à 200g.

3.1 Expression de la glycophorine A et quantification de l'énucléation

Ces paramètres sont évalués par un marquage tri-paramétrique comprenant :

- Un marqueur de survie FVS-V450 (Fixable Viability Stain V450, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) basé sur la liaison des amines qui permet de discriminer les cellules viables, faiblement fluorescentes, des cellules mortes donc perméables et par conséquent fortement fluorescentes.
- La détection de la glycophorine A (GYPA) qui est détectée avec un anticorps monoclonal de souris, anti-GYPA (clone 11E4B-7-6, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) couplé à la phycoérythrine (PE).
- Le DRAQ5^{TM} un intercalant de l'ADN utilisé pour évaluer le pourcentage d'énucléation.

Pour chaque temps $0,5x10^6$ cellules sont prélevées et lavées avec un tampon phosphate salin (PBS : NaCl 137 mM ; KCl 2,7 mM ; Na_2HPO_4 8 mM ; KH_2PO_4 1,5 mM ; Lonza, Vervieres, Belgique) additionné de 0,2% de BSA (PBS/0,2% BSA). Les cellules sont ensuite incubées une heure à 4°C à l'abri de la lumière avec 100 µl d'anti-GYPA dilué au 1/20 en PBS/0,2% BSA. Après un lavage avec du PBS à 4°C (centrifugation 200g, 5 min à 4°C), les cellules sont incubées 30 min à 4°C et à l'abri de la lumière dans 1ml de PBS contenant 1 µl de FVS-V450. Enfin, les cellules lavées avec du PBS à 4°C et centrifugées (200g, 5 min à 4°C) sont

incubées 30 min à 4°C à l'obscurité dans 100 µl d'une solution de DRAQ5™ dilué à 5µM en PBS. Les cellules sont alors directement analysées au cytomètre en flux. Parallèlement, l'autofluorescence est contrôlée en incubant 0,5x10^6 cellules avec un contrôle isotypique murin IgG1 couplé à la PE (Clone #11711, R&D Systems, Rungis, France).

3.2 **Expression de l'hémoglobine fœtale (HbF)**

L'hémoglobine fœtale (HbF) est détectée grâce à un anticorps monoclonal recombinant humain de type IgG1 (clone REA533) dirigé contre la sous unité gamma de l'hémoglobine et couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC ; Miltenyi Biotech).

Les cellules en différenciation (5x10^5 cellules) sont prélevées à différents temps, lavées avec du PBS et incubées en présence de FVS-V450 comme décrit précédemment. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS (200g, 5 min à 4°C) puis fixées et perméabilisées avec 100 µl de Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) pendant 20 min à l'abri de la lumière. Après un lavage avec 3 ml de Perm/Wash 1X (BD Biosciences) (400g, 5 min à 4°C), les cellules sont incubées pendant 10 min à température ambiante dans un volume de 200 µl de Perm/Wash 1X contenant l'anti-HbF dilué au 1/20. Après un dernier lavage en Perm/Wash 1X (400g, 5 min à TA), les cellules sont analysées en cytométrie en flux. Simultanément en contrôle, 0,5x10^6 cellules sont incubées avec l'isotype REA monoclonal couplé au FITC (clone REA293, Miltenyi Biotech).

3.3 **Expression membranaire de Emp/MAEA au cours de la différenciation**

La détection d'Emp/MAEA est réalisée par un marquage indirect associé en co-marquage avec le marqueur de viabilité FVS-V450 :

- un anticorps primaire polyclonal de lapin anti Emp/MAEA reconnaissant la partie amino-terminale de la protéine (abcam, Cambridge, Royaume-uni). Un peptide synthétique contenant les acides aminés 15 à 42 de la protéine Emp/MAEA humaine a été utilisé comme immunogène.

- un anticorps secondaire produit chez la chèvre est dirigé contre les IgG de lapin et couplé à l'Alexa Fluor® 488 (Lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA).

Les cellules en différenciation ($5x10^5$ cellules) sont prélevées à différents temps puis lavées avec du PBS/0,2% BSA. Elles sont incubées avec l'anticorps anti Emp/MAEA dilué au 1/20 dans 100 µl de PBS/0,2% BSA. Après une heure d'incubation à 4°C, les cellules sont lavées avec du PBS/0,2% BSA (200g, 5 min à 4°C). Les anticorps anti-Emp/MAEA fixés sont révélés à l'aide de l'anticorps secondaire dilué au 1/1.000 dans du PBS/0,2% BSA. Après une heure d'incubation à 4°C et à l'abri de la lumière, les cellules sont lavées avec du PBS à 4°C (200g, 5 min à 4°C), et incubées 30 min à 4°C et à l'abri de la lumière dans 1ml de PBS contenant 1 µl de FVS-V450. Après un dernier lavage, les cellules sont analysées en cytométrie en flux. Simultanément en contrôle, des cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire seul.

4- Extraction d'ARN et RT-PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

4.1 Extraction des ARN et reverse transcription (RT)

Aux différents jours de culture, $0,5x10^6$ cellules sont prélevées et lavées avec du PBS (5.000xg 3 min). Les ARN totaux sont extraits à partir des culots cellulaires à l'aide du kit d'extraction (RNeasy Micro Kit, Qiagen, Hilden, Allemagne) en réalisant une étape de digestion à la DNase (Qiagen) afin d'éliminer toute contamination par de l'ADN génomique.

Un pool d'ADN complémentaire (ADNc) est synthétisés à partir de 10 ng d'ARN totaux dénaturés (3 min à 70°C) par transcription inverse *via* l'utilisation de 100 Unités d'une transcriptase inverse du virus de la leucémie murine de Moloney (M-MLV RT, Fisher), d'hexamères aléatoires à 10 µM (*random hexamers*), de dNTP à 0,5 mM chacun, de 20 Unités de RNase inhibitor et du tampon dans un volume final de 20 µl. Après une heure à 42°C, une inactivation des enzymes est réalisée pendant 10 min à 92°C. Les ADNc sont conservés à -80°C jusqu'à réalisation des qPCR.

4.2 PCR quantitative en temps réel (qPCR)

La PCR quantitative en temps réel permet, grâce à un intercalant ADN fluorescent, de suivre la génération des produits de PCR spécifiques pendant la réaction d'amplification. La fluorescence est mesurée à chaque cycle de la PCR et un Cp (Crossing point) est défini. Il correspond pour chaque échantillon au nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence atteigne un seuil fixé dans la phase exponentielle de la réaction.

L'intercalant ADN fluorescent utilisé dans nos protocoles est le SybrGreen® qui s'incorpore dans le petit sillon de la double hélice d'ADN. Sa fluorescence est maximale lorsqu'il est inséré dans la double hélice alors qu'elle est quasiment nulle à l'état libre. La spécificité de la fluorescence émise va dépendre de la spécificité de la paire d'amorces utilisée pour cibler un transcrit d'intérêt. Cette spécificité est contrôlée à la fin de l'étape d'amplification grâce à la courbe de fusion qui met en évidence le pic de fusion de l'amplicon. La présence d'un pic unique indique la présence d'un produit de PCR unique caractérisé par sa température de fusion.

Parallèlement, afin de vérifier que la PCR est bien quantitative, un test d'efficacité est réalisé. Il consiste en une série de dilutions en cascade de 10 en 10 d'un échantillon positif (dans notre cas des plasmides). La pente de la droite exprimant le logarithme de la concentration en produit en fonction du Cp doit être comprise entre -3,2 (efficacité de 108%) et -3,45 (efficacité de 90%).

Au cours de nos cultures, nous avons analysé le taux des transcrits des chaines de globine γ (composant de l'hémoglobine fœtale) et β (composant de l'hémoglobine adulte) ainsi que le taux de transcrit de l'Emp/MAEA. Pour normaliser nos résultats, nous avons également amplifié l'ARNr 28S (Ouaissi *et al*., 2014). Le tableau II compile les couples d'amorces que nous avons utilisés ainsi que leur concentration finale.

Tableau II. Séquences des amorces de qPCR et concentration finale

Amorces	Séquence (5'→3')	nM final
28S	TCCATCATCCGCAATGTAAA	300
	TGTGACAGACCATTCCCATC	300
Hb-beta	CTCGGTGCCTTTAGTGATGG	300
	ACCAGCCACCACTTTCTGAT	300
Hb-gamma	GTCTACCCATGGACCCAGAG	600
	AACGGTCACCAGCACATTTC	600
Emp-ex4-5	GCCAAAGAGGTGGAGGAGTC	300
	TTCTGCCGGATGCGTTCAAT	300

Les PCR quantitatives sont réalisées à l'aide d'un appareil CFX96 Real System-C1000 (Biorad, Hercules, CA, USA) à partir de 1/20 du produit de transcription inverse, 12,5 µl de SybrGreen master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), et les amorces spécifiques du transcrit d'intérêt dans un volume final de 25 µl. Les séquences sont amplifiées grâce au programme commençant par une étape de dénaturation de 10 min à 95°C suivi de 45 cycles : 10 sec de dénaturation à 95°C, et 30 sec à 60°C pour l'hybridation et l'élongation. A la fin de la réaction, la courbe de fusion est réalisée par une mesure en continu de la fluorescence entre 65°C et 95°C. Tous les échantillons sont testés en duplicat. Pour chaque couple d'amorces, un témoin négatif dans lequel l'ADNc est remplacé par de l'eau est réalisé. Une gamme de plasmides est réalisée pour chaque transcrit dans chaque expérience. Cette gamme permet de s'assurer du caractère quantitatif de la réaction (efficacité de PCR comprise entre 90 et 108%) et de déterminer le nombre de copies (NC) de transcrit dans l'échantillon testé.

5- Immunofluorescence

5.1 Marquage sur cellules non perméabilisées

La glycophorine A et l'Emp/MAEA sont détectées à la membrane des cellules par triple marquage en utilisant :

- un anticorps monoclonal anti-GYPA biotinylé produit chez le rat (clone YTH89.1, Lifetechnologies).

- un anticorps polyclonal de lapin anti-Emp/MAEA dirigé contre l'extrémité amino-terminale de la protéine (abcam, Cambridge, Royaume-uni). Un peptide synthétique contenant les acides aminés 15 à 42 de la protéine Emp/MAEA humaine a été utilisé comme immunogène.
- un anticorps secondaire produit chez la chèvre est dirigé contre les IgG de lapin et couplé à l'Alexa Fluor® 488 (Lifetechnologies).
- de la streptavidine couplée à l'Alexa Fluor® 594 (Lifetechnologies).
- le DRAQ5™ utilisé pour visualiser les noyaux.

Le marquage des deux protéines membranaires se fait simultanément sur $1x10^5$ cellules lavées avec du PBS. Une première incubation dans un volume réactionnel de 100 µl de PBS/0,2BSA contenant l'anti Emp/MAEA dilué au 1/20 et l'anti-GYPA dilué 1/100 est réalisée une heure à 4°C. Les cellules sont lavées avec du PBS/0,2% BSA (200g, 5 min, 4°C) et incubées dans 100 µl de PBS/0,2% BSA contenant l'anticorps anti-IgG de lapin dilué 1/1.000 et la streptavidine diluée au 1/10.000. Après 1h d'incubation à 4°C et à l'obscurité, les cellules sont lavées et les noyaux sont contremarqués 30 min dans une solution de DRAQ5™ (5µM). Après un bref lavage avec du PBS les cellules sont déposées sur lame par cytospin et les lames sont montées avec du milieu Prolong® gold antifade (molecular probes, Eugene, OR, USA).

Les lames sont ensuite analysées sous un microscope à fluorescence Olympus BX41 couplé à une caméra CCD C11440-42U (Hamamatsu, Japon). La fluorescence est verte pour Emp/MAEA, rouge pour GYPA, et rouge lointain pour le DRAQ5™ (visualisée en fausse couleur bleue).

5.2 Marquage sur cellules fixées et perméabilisées

La glycophorine A et l'Emp/MAEA total sont détectées à la membrane des cellules par triple marquage en utilisant :
- un anticorps monoclonal anti-GYPA biotinylé produit chez le rat (clone YTH89.1, Lifetechnologies).
- un anticorps polyclonal de lapin anti-Emp/MAEA dirigé contre l'extrémité carboxy-terminale de la protéine (Lifetechnologies). Un peptide synthétique contenant les acides aminés 169 à 396 de la protéine Emp/MAEA humaine a été utilisé comme immunogène.

- un anticorps secondaire produit chez la chèvre est dirigé contre les IgG de lapin et couplé à l'Alexa Fluor® 488 (Lifetechnologies).
- de la streptavidine couplée à l'Alexa Fluor® 594 (Lifetechnologies).
- le DRAQ5™ utilisé pour visualiser les noyaux.

A différents temps de culture, $1x10^5$ cellules lavées avec PBS sont incubées 1h à 4°C dans 100 µl de tampon PBS/0,2% BSA contenant une dilution 1/100 d'anticorps anti-GYPA. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS/0,2% BSA (200g, 5 min, 4°C). Elles sont déposées sur lame par cytospin, fixées et perméabilisées dans 100 µl de Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) pendant 20 min à température ambiante dans une chambre humide. Toutes les étapes suivantes sont réalisées en chambre humide à température ambiante, le tampon utilisé pour les lavages et les incubations est le BD Perm/Wash buffer™ (BD Pharmingen) qui contient de la saponine. Les cellules lavées sont incubées dans 50 µl d'anti Emp/MAEA dilué 1/50. Après un bref lavage, les cellules sont incubées 1h et à l'obscurité en présence de l'anticorps secondaire dirigé contre les IgG de lapin dilué 1/1.000 et la streptavidine diluée 1/10.000. Après un dernier lavage le contremarquage des noyaux et le montage des lames sont réalisés comme précédemment.

Les lames sont ensuite analysées en lecture séquentielle en microscopie confocale sur le Leica TCS SP5. Les seuils de positivité pour les trois fluorescences sont établis à partir de témoins négatifs (anticorps secondaires seuls) et de mono-marquages (marquage Emp/MAEA ou GYPA). La fluorescence est verte pour Emp/MAEA, rouge pour GYPA, et rouge lointain pour le DRAQ5™ (visualisée en fausse couleur bleue).

6- Western Blot

Aux différents stades de différenciation de J+6 à J+17, des culots secs de $0,5x10^6$ cellules sont réalisés. La lyse des cellules se fait dans 100 µl de tampon RIPA (25 mM Tris-HCl pH-8, 200 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP40) contenant des inhibiteurs de protéases (*Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail*, Roche Diagnostics, Meylan France). Après 30 min d'incubation dans la glace en vortexant toutes les 10 min, les lysats sont centrifugés 10 min à 10.000 rpm à 4°C. Le surnageant est prélevé et la concentration protéique est déterminée *via*

l'utilisation du kit *BCA™ Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific), selon les recommandations fournisseurs.

Les échantillons (30 µg de protéines totales par puits) sont dénaturés 5 min à 95°C en présence de tampon Laemmli contenant du β-mercaptoéthanol. Le marqueur de taille *Prestained Protein Ladder* (Euromedex, Souffelweyersheim, France) est utilisé pour déterminer la taille des protéines détectées (10 à 170 kDa). Les protéines sont séparées par migration sur un gel de polyacrylamide concentré à 10%, puis transférées sur une membrane de nitrocellulose en présence de 20% de méthanol. La validation de la migration et du transfert est visualisée grâce à l'utilisation d'une solution de rouge ponceau à 0,1% (Sigma). La membrane est ensuite saturée pendant 30 min dans une solution de PBS contenant 3% de BSA. La détection des protéines Emp/MAEA et β-actine (contrôle de dépôt et de normalisation) est réalisée simultanément *via* des marquages indirects. La membrane de nitrocellulose est incubée toute la nuit dans du tampon PBS/1% BSA contenant l'anticorps polyclonal de lapin anti Emp/MAEA dirigé contre la partie amino-terminale de la protéine (abcam) (dil 1/200) et un anticorps de souris IgG1 anti-β actine (clone AC-15, Sigma) (dil 1/2.000). La membrane est ensuite lavée 3 fois 10 min dans du PBS contenant 0,05% de Tween 20 puis est incubée pendant une heure dans un mélange d'anticorps secondaires composé d'un anti-IgG1 de souris couplé à l'Alexa Fluor®488 (Lifetechnologies) (dil 1/3.000) et d'un anticorps anti-IgG de lapin couplé à la HPR (*Horseradish Preoxydase*, Cell Signaling, Saint Quentin Yvelines) (dil 1/3.000). Après 3 lavages de 10 min avec du PBS contenant 0,05% de Tween 20, la révélation se fait sur un imageur ImageQuant™ LAS 4000 (GE healthCare Life Science, Velizy-Villacoublay, France) par lecture de la fluorescence pour la β-actine et une révélation à ECL Prime western blot detection Reagent (GE healthCare Life Science) pour mettre en évidence la protéine Emp/MAEA.

Résultats

La première étape de ce travail a consisté en la mise en place et la validation, au sein du laboratoire, d'un modèle de différenciation érythroïde *in vitro* de cellules humaines CD34$^+$. Dans une seconde étape ce modèle nous a permis d'étudier l'expression d'Emp/MAEA dans les cellules érythroïdes en différenciation

1- Mise en place du modèle de primo-cultures de cellules CD34$^+$ en différenciation érythroïde

1.1. Détermination des stades de différenciation

Les cellules CD34$^+$ sont induites en différenciation EPO-dépendante à partir de J+6. Pour identifier les types cellules, une coloration MGG est réalisée à différents temps et les cellules sont identifiées et comptées par un hématologue. La figure 10A illustre la morphologie des cellules présentes aux jours 10, 13, 15 et 17 après coloration MGG. Avant J+10, les cellules sont des progéniteurs qu'il est impossible d'identifier par coloration MGG.

A J+10 toutes les cellules sont des précurseurs, et seuls des proérythroblastes ainsi que des cellules non érythroïdes (cellules myélomonocytaires et myéloblastes) sont observés. Les premières cellules matures (érythroblastes polychromatophiles et acidophiles) sont identifiées à J+13, la différenciation se poursuit jusqu'à J+17.

Pour chaque temps de culture, nous avons évalué la proportion des différentes populations d'érythroblastes dans huit cultures indépendantes et nous avons calculé les moyennes (Figure 10B). A J+13, 73% des cellules de nos cultures sont des cellules immatures (pro-érythoblastes et/ou érythroblastes basophiles), ce pourcentage n'est plus que de 65% à J+17. De manière symétrique le pourcentage de cellules matures double entre J+13 et J+17, passant de 17% à 34%. Des cellules myélomonocytaires sont observées en faible proportion dans toutes nos cultures. Ces cellules de la lignée myéloïde représentent en moyenne 11% de la population cellulaire totale à J+13 mais ne représentent plus que 1% à J+17.

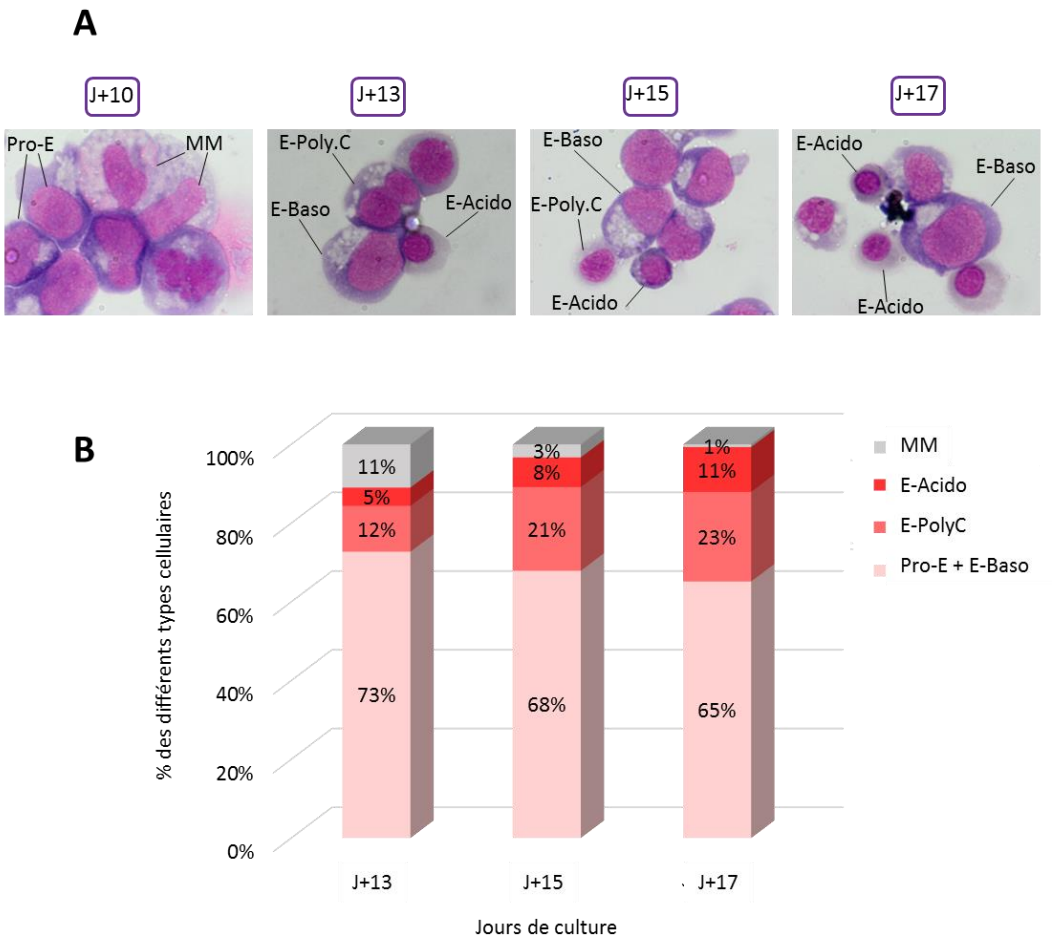


Figure 10 : Identification des précurseurs érythroïdes.
A : coloration MGG d'une culture représentative. Pro-E: proérythroblaste. E-Baso: érythroblaste basophile. E-Poly.C: érythroblaste polychromatophile. E-Acido: Erythroblaste acidophile. MM : cellules myélomonocytaires. B : Répartition des précurseurs érythroïdes au cours du temps (moyenne des pourcentages de 8 cultures indépendantes).

1.2. Expression de la glycophorine A et quantification de l'énucléation

L'engagement des cellules dans le lignage érythroïde est évalué par mesure de l'expression de la glycophorine A (GYPA), un marqueur érythroïde spécifique, par cytométrie en flux. La figure 11A illustre un exemple de résultat issu d'une expérience type (représentation sous forme d'histogramme) ainsi que les médianes du pourcentage de cellules positives et de l'intensité du marquage exprimé en RFI (*Relative Fluorescence Intensity*, ratio $MFI_{GYPA}/MFI_{isotype}$). A J+6, avant l'induction de la différenciation EPO-dépendante, une faible proportion de cellules exprime la GYPA (médiane de 2%). Après l'ajout de l'EPO, le pourcentage de cellules GYPA positives s'accroit très rapidement pour atteindre 50% à J+10

et plus de 90% J+17. L'expression de la GYPA est d'abord modérée (GYPA^{med}) à J+10, puis une population plus fortement marquée (GYPA^{fort}) apparait dès J+13. En fin de culture la quasi-totalité des cellules expriment fortement la GYPA (médiane du pourcentage de cellules positives de 91%). La médiane des RFI augmente tout au long de la culture. On observe un accroissement d'un facteur 3 entre J+6 et J+10 et pour atteindre un facteur 9 à J+17 (Figure 11A).

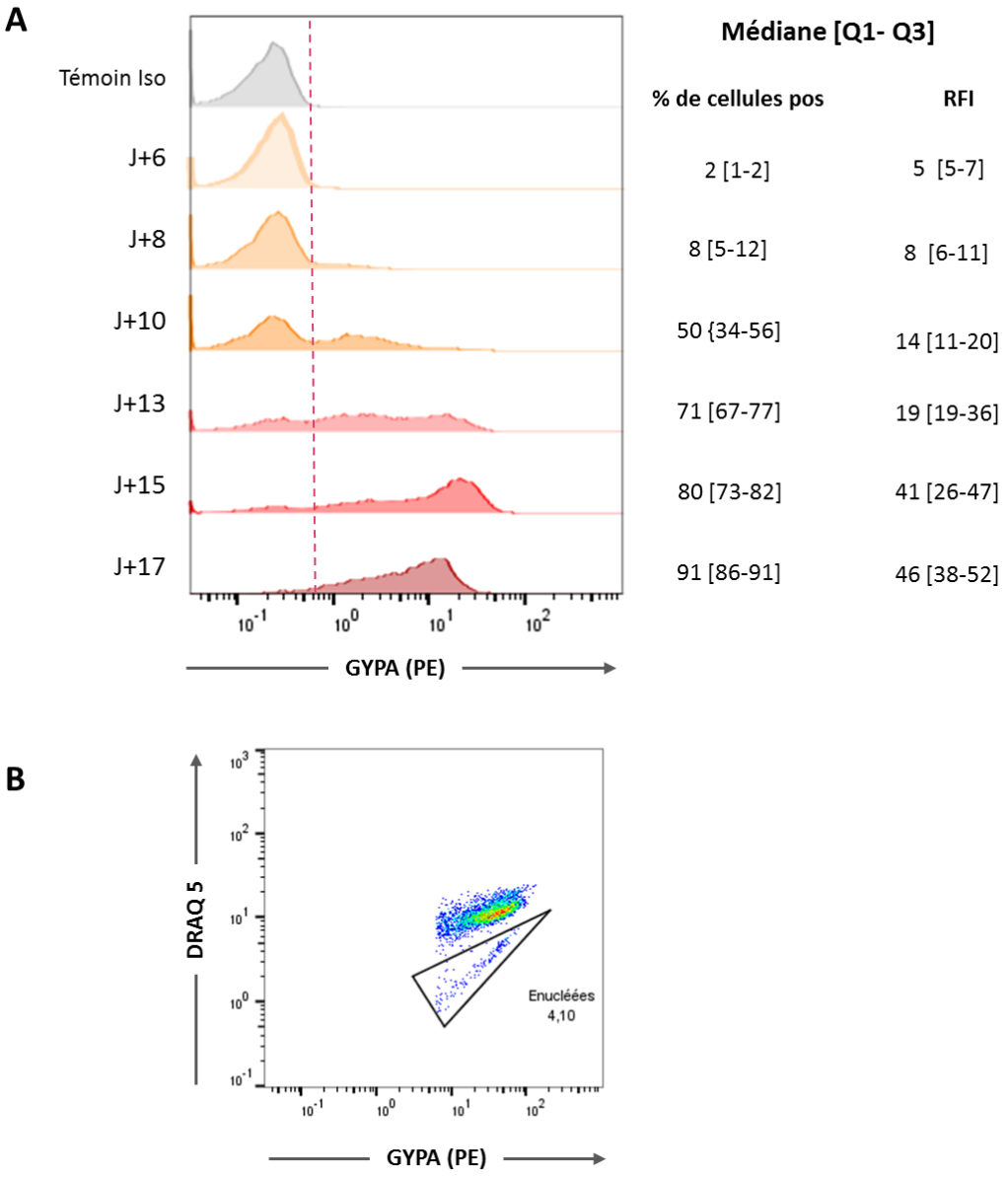


Figure 11 : Expression de la GYPA et énucléation dans notre modèle de culture.
Aux temps indiqués, les cellules en différenciation sont analysées en cytométrie en flux pour l'expression membranaire de la GYPA et pour le taux d'énucléation. A : Cinétique d'expression de la GYPA dans une culture type. A droite, médiane [Q1-Q3] des pourcentages de cellules GYPA-positives et intensité du marquage (8 cultures indépendantes). B : Exemple de mesure de l'énucléation d'une culture à J+17 (4.10% d'énucléation).

L'énucléation des cellules en culture est quantifiée par cytométrie en flux grâce au DRAQ5^{TM}. Les cellules GYPA^{fort}/ DRAQ5$^{faible/nég}$, qui sont considérées comme ayant expulsé leur noyau, représentent environ 1% des cellules GYPA^{fort} à J+13. Ce pourcentage peut atteindre 4 à 5% entre J+15 et J+17 mais reste en moyenne de l'ordre de 2% (Figure 11B).

1.3. Expression de l'hémoglobine fœtale au cours de la différenciation

Pour consolider les résultats obtenus avec la GYPA, j'ai évalué l'expression d'un autre marqueur spécifique de la différenciation érythroïde à savoir l'hémoglobine fœtale (HbF). Ainsi, l'étude cinétique de l'hémoglobine fœtale est réalisée par cytométrie en flux. Parallèlement le taux des transcrits des chaines de globine gamma (ϒ, composante de l'hémoglobine fœtale,) et béta (β, composante de l'hémoglobine adulte, HbA) ont été quantifiés par RT-qPCR.

A J+6, tout comme à J+8 seulement 10% des cellules expriment l'hémoglobine fœtale. C'est à partir de J+10 qu'une augmentation de la médiane du pourcentage de cellules HbF positives est observée, 50% à J+10, pour atteindre 89% à J+17. En fin de culture toutes les cellules expriment fortement l'hémoglobine fœtale. La médiane des RFI augmente parallèlement au pourcentage de cellules positives. Ainsi l'augmentation est d'un facteur 5 entre J+6 et J+10 et atteint un facteur 11 à J+17 (Figure 12A).

Ces résultats sont en corrélation avec les analyses des transcrits des chaines γ (Figure 12B). En effet, en réponse à l'EPO, l'expression des chaines de globine γ augmente très rapidement comme le montre les moyennes du nombre de copies normalisées (NCN) par rapport à J+6. Entre J+6 et J+8, l'accroissement est d'un facteur 10, il est d'un facteur 100 entre J+6 et J+10 et atteint un facteur d'environ 700 à J+17.

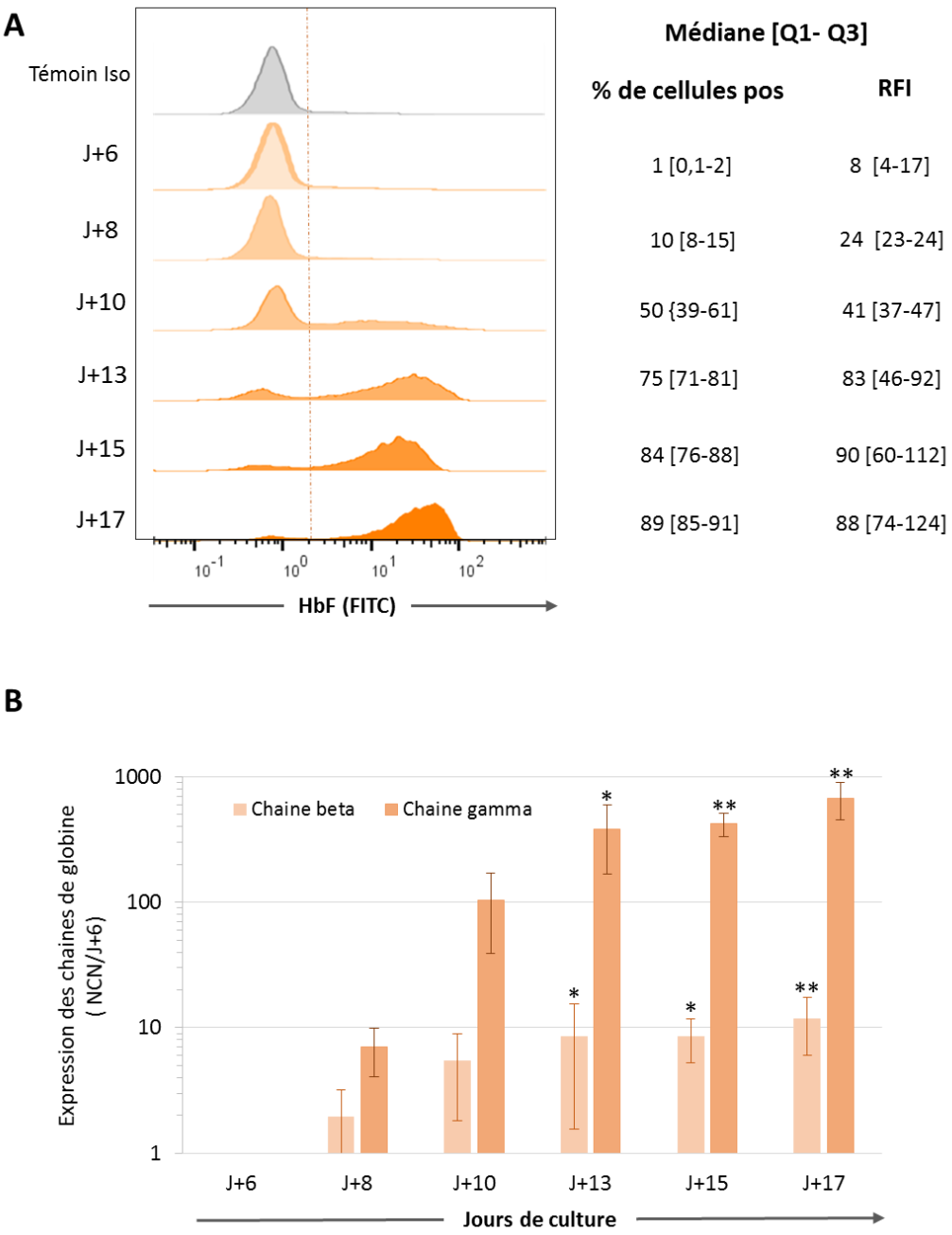


Figure 12 : Cinétique d'expression de l'hémoglobine fœtale.
*Aux temps indiqués, l'expression des chaines de globines est mesurée. A : Cinétique d'expression de l'hémoglobine fœtale dans une culture type, et médiane [Q1-Q3] des pourcentages de cellules positives et de l'intensité de fluorescence mesurée en RFI de 5 cultures indépendantes. B : Expression des chaines β et γ de globine par RT-PCR quantitative. Moyenne +/- SD du nombre de copies normalisées (NCN) par rapport à J+6 de 4 cultures indépendantes. * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$, test de comparaison de Friedman (Georgin P. et Gouet M. 2000)*

L'expression du transcrit de la chaine de globine β, composant de l'hémoglobine adulte, augmente également au cours de la cinétique. Cependant, l'amplitude de la réponse, beaucoup plus faible, ne dépasse pas un facteur 10 et atteint un plateau dès J+10 (Figure 12B).

D'après nos résultats de RT-qPCR, le calcul des proportions des chaines ϒ de globine par rapport aux chaines totales (ϒ+β) démontre que l'hémoglobine fœtale représente toujours plus de 70% de l'hémoglobine totale à J+10 pour atteindre plus de 90% à partir de J+13 et ce jusqu'à J+17 (tableau III). Ces proportions sont répétables sur les 4 cultures réalisées indépendamment.

Tableau III : Proportion des chaines gamma (ϒ) exprimées.

Culture	ϒ/(ϒ+β) (%)			
	J+10	J+13	J+15	J+17
A	74	89	92	92
B	86	90	91	93
C	77	89	92	93
D	81	91	94	95

ϒ/(ϒ+β) est une estimation de l'hémoglobine fœtale (chaine ϒ) par rapport à l'hémoglobine totale (chaine ϒ+β). Le calcul est réalisé en fonction du nombre de copies de chaque transcrit pour quatre cultures indépendantes.

2- Expression Emp/MAEA au cours de la différenciation

Dans notre modèle de culture *in vitro*, nous avons évalué l'expression totale de Emp/MAEA en mesurant la protéine Emp/MAEA par western blot et le taux de transcrit par RT-PCR quantitative. Nous avons ensuite analysé l'expression membranaire d'Emp/MAEA par cytométrie en flux et par immunofluorescence.

2.1 Expression de la protéine totale

La quantification du transcrit d'Emp/MAEA a été réalisée par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en nombre de copies normalisées par rapport à l'ARNr 28S rapporté à la valeur à J+6 (NCN/J+6). Comme le montre le tableau IV, quel que soit le jour de culture, le NCN/J+6 reste proche de 1 et aucune différence statistiquement significative n'est mise en évidence par le test de Friedman (risque d'erreur de 5%). Ainsi la quantité de transcrit Emp/MAEA dans nos cultures est constante.

Tableau IV: Quantification du transcrit Emp/MAEA mesurée par RT-Qpcr. Les résultats sont exprimés en nombre de copies normalisées par rapport à l'ARNr 28S et rapportés à J+6 (moyenne de 4 cultures indépendantes).

Jours de culture	Nombre de copies Emp normalisé par rapport à J+6
6	1,0
8	1,1
10	1,0
13	0,9
15	1,1
17	1,3

L'expression de la protéine Emp/MAEA a également été étudiée par western blot dans les lysats cellulaires totaux. En accord avec les résultats de RT-qPCR, aucune modification significative de la quantité de protéine Emp/MAEA n'est observée par western blot (Figure 13).

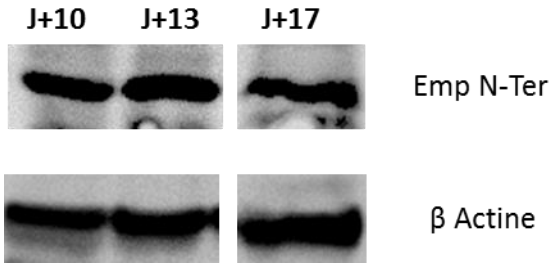


Figure 13 : Expression d'Emp/MAEA au cours de la cinétique de différenciation.
Western-blot réalisé sur lysats cellulaires totaux à J+10, J+13 et J+15. La β–actine est utilisée comme témoin de dépôt.

2.2 Expression membranaire de la protéine Emp/MAEA

L'expression membranaire de cette protéine a été mesurée par cytométrie en flux en utilisant un anticorps dirigé contre l'extrémité amino-termianle extracellulaire de la protéine. Les résultats d'une culture type sont présentés dans la figure 14A. Entre J+13 et J+17 toutes les cellules sont positives pour la détection de l'Emp/MAEA avec un aspect de double population visible à J+15. De plus, toutes les RFI sont faibles et diminuent au cours du temps. Un marquage similaire est observé de manière répétée dans 3 cultures indépendantes avec

cependant un aspect de double population à J+15 plus ou moins marqué selon les cultures (Figure 14B).

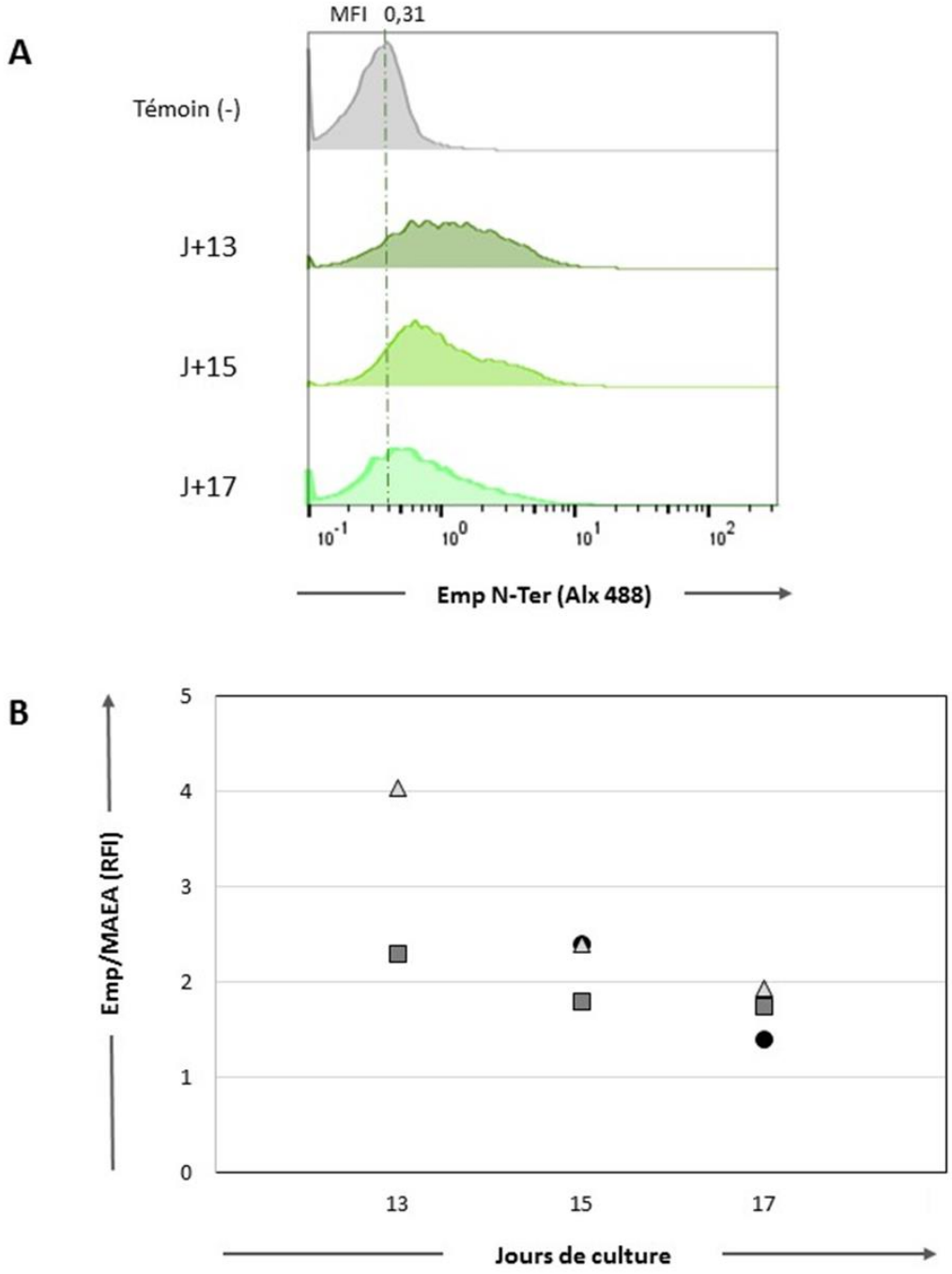


Figure 14 : Détection de la protéine Emp/MAEA par cytométrie en flux.
A : Cinétique d'expression d'Emp/MAEA dans une culture type. B : Intensité de fluorescence mesurée en RFI sur trois cultures indépendantes en fonction du temps.

Des tests de corrélation de Spearman (https://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/) entre l'intensité du marquage Emp/MAEA membranaire ($RFI_{Emp/MAEA}$) et différents paramètres de la

maturation érythroïde ont été réalisés (Tableau V). Ainsi, lorsque je recherche une corrélation entre la $RFI_{Emp/MAEA}$ et les principaux paramètres étudiés (expression de la GYPA, des chaines de globine et pourcentage de cellules matures), je n'observe aucune corrélation statistiquement significative ($p>0.05$). En revanche une corrélation positive très élevée ($\rho=0,9386$) et statistiquement significative ($p < 0,01$) a été démontrée entre la $RFI_{Emp/MAEA}$ et le pourcentage de cellules myélomonocytaires présentes dans les cultures (Figure 10).

Tableau V : Corrélation de l'intensité du marquage Emp/MAEA avec les paramètres de la différenciation érythroïde

Paramètre considéré	**ρ de Spearman**	**p**
Cellules $GYPA^+$ (%)	-0,6905	0,069
Cellules $GYPA^+$ (RFI)	-0,0958	0,821
Chaine beta globine (NCN)	-0,1677	0,691
Chaine gamma-globine (NCN)	-0,1317	0,756
Cellules matures cells (%)	-0,6667	0,083
Cellules myélomonocytaires (%)	**0,9386**	**0,00055**

Pour confirmer l'expression membranaire d'Emp/MAEA dans les cellules érythroïdes j'ai réalisé des marquages en immunofluorescence à J+15 et J+17 (Figure 15). Le double marquage des cellules non fixées avec un anticorps dirigé contre l'extrémité N-terminale extracellulaire d'Emp/MAEA et un anti-GYPA permet de montrer que les cellules positives pour l'Emp/MAEA sont également positives pour la GYPA (Figure 15A). On observe également des cellules positives pour l'Emp/MAEA et négatives pour la GYPA et *vice versa* (cellules indiquées par une flèche blanche). Le marquage DRAQ5™ est le témoin de la présence de cellules nucléées.

L'analyse en microscopie confocale de cellules marquées avec l'anti-Emp/MAEA N-ter révèle un marquage de faible intensité mais l'image est compatible avec un marquage membranaire (Figure 15B en haut). L'utilisation d'un anti-Emp/MAEA dirigé contre l'extrémité carboxy-terminale intracellulaire de la protéine permet d'obtenir un marquage plus intense. Par ailleurs, cet anticorps permet de mettre en évidence une coprésence à la membrane d'Emp/MAEA et de la GYPA (Figure 15B en bas en jaune).

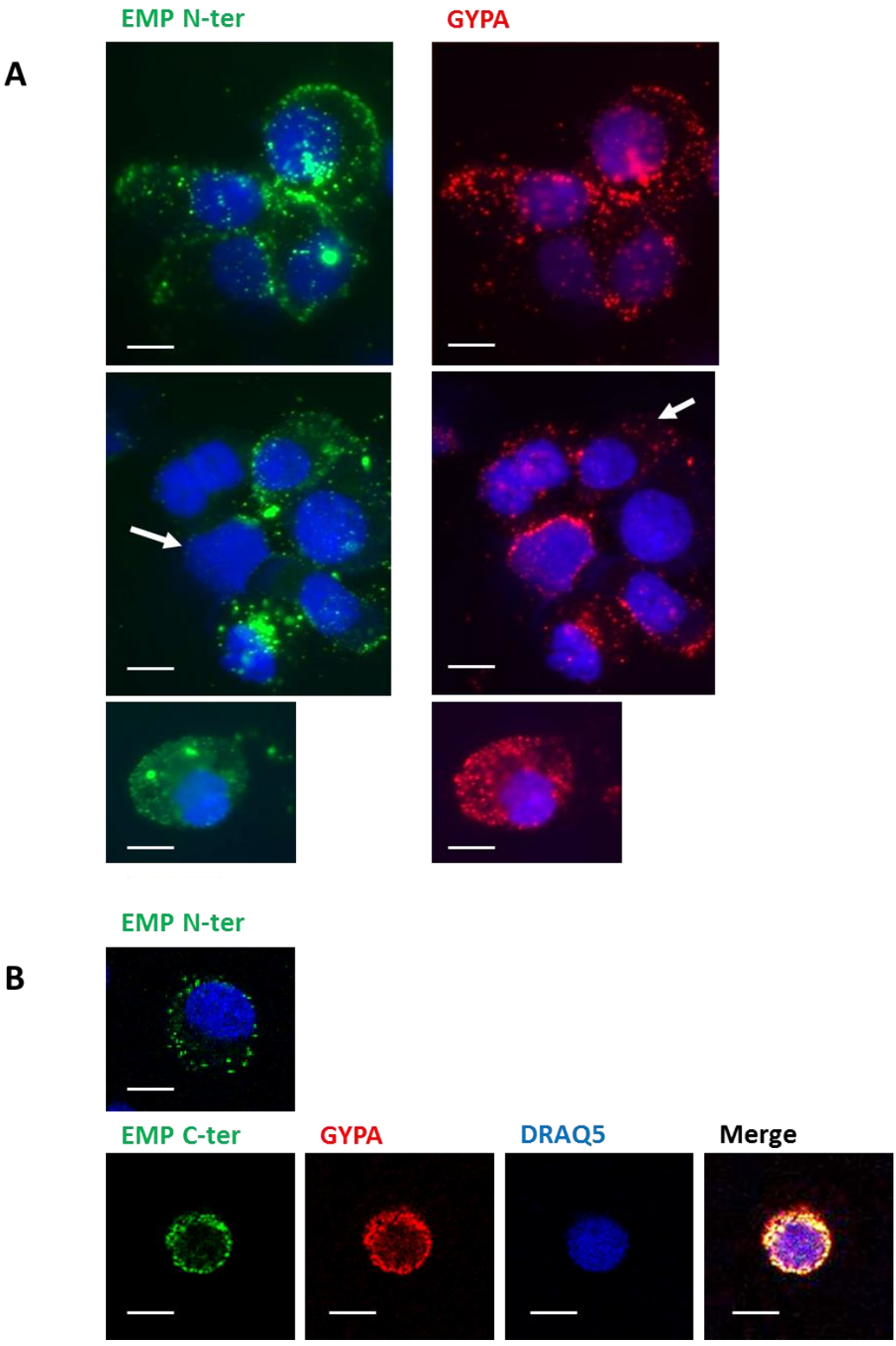


Figure 15 : Immunofluorescence des cellules en différenciation.
L'Emp/MAEA est en vert, la GYPA en rouge et le DRAQ5 en bleu
A : Microscopie à fluorescence. Les flèches blanches indiquent les cellules positives pour la GYPA et négatives pour l'Emp/MAEA et inversement. B : Microscopie confocale. L'image « merge » montre la coprésence de la GYPA et de l'Emp/MAEA à la membrane. La barre représente 5 µm.

Discussion et perspectives

La protéine Emp/MAEA est une protéine nucléaire ubiquitaire qui a été mise en évidence au niveau membranaire dans les érythroblastes et les macrophages (Hanspal and Hanspal, 1994). Plusieurs rôles lui sont connus non seulement au niveau des cellules érythroïdes mais également au niveau des cellules non érythroïdes. Dans la lignée hématopoïétique, il a été décrit que la protéine Emp/MAEA est un des acteurs principaux dans plusieurs mécanismes cellulaires tel que l'adhésion cellulaire entre les macrophages et les érythroblastes (formation des îlots érythroblastiques) et entre les érythroblastes, la maturation terminale et le mécanisme d'énucléation des cellules érythroïdes. Elle jouerait même un rôle dans l'inhibition de l'apoptose des érythroblastes (Hanspal and Hanspal, 1994; Soni et *al*., 2006).

Parallèlement une redistribution de la protéine a été montrée au cours de la maturation des macrophages murins (Soni *et al*., 2007). En revanche, les mécanismes de régulation de la protéine Emp/MAEA ainsi que sa localisation sub-cellulaire au cours de la différenciation érythroïde chez l'homme demeurent toujours inconnus. C'est pourquoi nous avons entrepris d'étudier la cinétique d'expression d'Emp/MAEA ainsi que sa localisation membranaire au cours de la différenciation érythroïde dans des cultures de cellules $CD34^+$.

1- Modèle de culture des cellules $CD34^+$ en différenciation

Dans notre modèle de différenciation érythroïde *in vitro* qui se déroule en deux temps, une phase de prolifération et une phase de différenciation EPO-dépendante (Zermati *et al.*, 2000), nous observons bien une différenciation érythroïde démontrée par les colorations cytologiques, réalisées à différents temps, mais également par l'expression des marqueurs érythroïdes spécifiques (GYPA et HbF). Parallèlement, nos résultats de qPCR indiquent que plus de 90% de l'hémoglobine produite est de l'hémoglobine fœtale *versus* 10% d'hémoglobine adulte. Ces résultats corroborent les études précédentes (Jin *et al*., 2014) qui mettent en évidence que les cellules $CD34^+$ isolées de sang de cordon expriment majoritairement de l'HbF alors que celles isolées de sang périphérique expriment 95% d'hémoglobine adulte (Jin *et al*., 2014; Pourcher *et al*., 2011).

Au terme de la culture (J+17), plus de 90% de cellules expriment la GYPA. D'après les résultats de MGG, il semble que les cellules GYPA-négatives soient des proérythroblastes (exprimant très faiblement la GYPA) ou des cellules de la lignée myélomonocytaire. Afin de les

distinguer, des tests de cytométrie en flux multiparamétriques devront être mis en place dans le but de caractériser plus précisément de quel type cellulaire il s'agit et aussi de déterminer leur proportion (Hu *et al*., 2013).

En fin de culture le pourcentage de cellules énucléées reste faible (2 à 4%) comparé aux données de la littérature (Zermati *et al*., 2000). Plusieurs éléments peuvent être à l'origine de cette différence

- premièrement nos cultures sont réalisées avec des cellules $CD34^+$ congelées qui montrent un potentiel de différenciation inférieur par rapport à celui des cellules issues de cordon frais
- deuxièmement contrairement à d'autres études, nous n'avons pas isolé les cellules $CD36^+$ après la phase de prolifération. Cette purification permet d'obtenir une population pure à 95% de progéniteurs érythroïdes intermédiaires et tardifs (Zermati *et al*., 2000).

Néanmoins, à partir de J+13 tous les stades de maturation sont présents (proérythroblaste, érythroblaste basophile, érythroblaste polychromatophile et érythroblaste acidophile) alors que seuls des érythroblastes immatures sont observés à J+10, de plus en fin de culture le pourcentage de cellules matures atteint 30% en moyenne. Il nous est apparu pertinent de rechercher la protéine Emp/MAEA à la membrane des cellules à J+13, J+15 et J+17, au regard du rôle avéré d'Emp/MAEA dans les interactions macrophage/érythroblaste et surtout érythroblaste/érythroblaste chez l'homme (Hanspal and Hanspal, 1994; Mao *et al*., 2013).

2- Analyse de l'expression d'Emp/MAEA dans notre modèle

Nous avons dans un premier temps évalué l'expression globale d'Emp/MAEA. L'étude transcriptionnelle de RT-qPCR n'a pas mis en évidence de modification du transcrit au cours de nos cinétiques. Ceci a été confirmé par les analyses en western blot sur lysats totaux qui ne montrent pas de variation quantitative de protéine au cours du temps. A ce jour, aucune étude n'a révélé de régulation d'Emp/MAEA, ni au niveau transcriptionnel, ni au niveau protéique. Les seules modifications mises en évidence concernent la distribution sub-cellulaire de la protéine qui a notamment été étudiée au cours de la maturation des

macrophages où seulement 5% de la protéine est détectée à la membrane des cellules immatures *versus* près de 70% dans les cellules matures (Soni *et al.*, 2007).

Afin évaluer la présence d'Emp/MAEA à la membrane des cellules nous avons utilisé la cytométrie en flux qui est une technique sensible ayant pour avantage de déterminer si la population exprime de façon homogène le marqueur d'intérêt ou si plusieurs sous-populations co-existent (négative/positive, faible/fort) et de quantifier l'intensité du marquage.

A l'aide d'un anticorps ciblant l'extrémité amino-terminale extracellulaire de la protéine, nous démontrons la présence de la protéine Emp/MAEA à la membrane de toutes les cellules présentes dans nos cultures aux différents temps analysés. Il est remarqué que la quasi-totalité de ces cellules sont des précurseurs érythroïdes comme le montrent les analyses de cytométrie en flux *via* les marqueurs GYPA et HbF ainsi que l'observation des colorations MGG. Ainsi, Emp/MAEA serait exprimé à la membrane des érythroblastes aussi bien immatures que matures ce qui est cohérent avec le rôle de la protéine décrit au cours de l'érythropoïèse tardive (Hanspal and Hanspal, 1994; Hanspal *et al.*, 1998; Soni *et al*., 2006; Soni *et al*., 2008). Cependant, les co-marquages en immunofluorescence mettent en évidence la présence dans nos cultures non seulement de cellules positives pour Emp/MAEA et GYPA mais également de cellules positives uniquement pour la GYPA ou uniquement pour l'Emp/MAEA. Plusieurs éléments doivent être pris en compte pour expliquer cette hétérogénéité. Ainsi, les cellules myélomonocytaires sont susceptibles d'exprimer l'Emp/MAEA comme cela a été décrit dans le macrophage (Soni *et al*., 2007). L'hétérogénéité observée en immunofluorescence peut aussi être due à des difficultés techniques. En effet, l'intensité du marquage Emp/MAEA est faible (aussi bien en cytométrie de flux qu'en immunofluorescence) ce qui peut être dû à une faible expression de la protéine et/ou à une faible affinité/avidité de l'anticorps utilisé (un anticorps polyclonal de lapin). Comme l'intensité de marquage diminue au cours du temps en cytométrie, et comme nos marquages en immunofluorescence sont moins sensibles que la cytométrie, on peut suggérer que dans nos analyses d'immunofluorescence :

- les cellules positives uniquement pour l'Emp/MAEA seraient les plus immatures. Elles exprimeraient fortement Emp/MAEA et plus faiblement la GYPA ($GYPA^{faible}/Emp^{fort}$)
- les cellules positives uniquement pour la GYPA seraient les plus matures. Elles exprimeraient fortement la GYPA et plus faiblement l'Emp/MAEA ($GYPA^{fort}/Emp^{faible}$)

- les cellules positives pour les deux protéines seraient de maturité « intermédiaire » ($GYPA^{med}/Emp^{med}$)

L'hypothèse d'une faible affinité/avidité de l'anticorps est supportée par les images de microscopie confocale. En effet, l'intensité du marquage avec l'anticorps dirigé contre l'extrémité amino-terminale de l'Emp/MAEA est très faible, à la limite de la technique. Bien que le marquage reste faible, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'extrémité carboxy-terminale facilite grandement la réalisation des images et permet de démontrer sans ambiguïté la localisation membranaire de l'Emp/MAEA.

Des études complémentaires utilisant des techniques plus sensibles comme la cytométrie en flux devront nous permettre de déterminer si, comme nous le pensons, des cellules $GYPA^{faible}/Emp^{fort}$, $GYPA^{med}/Emp^{med}$ et $GYPA^{fort}/Emp^{faible}$ co-existent dans nos cultures. D'une façon plus générale, l'utilisation de ces outils devrait également permettre d'identifier les cellules qui expriment l'Emp/MAEA et d'évaluer si une modification de l'intensité de fluorescence est observée en fonction du stade de différenciation (érythroblastes à différents stades et/ou myélomonocytes). Ces données seront utiles pour définir si les cellules présentant la $RFI_{Emp/MAEA}$ maximale sont à un stade particulier de la maturation érythoïde, ou s'il s'agit de cellules myélomonocytaires.

De façon surprenante, nous avons observé une diminution de la RFI du marquage Emp/MAEA au cours du temps. En effet, l'Emp/MAEA est impliqué dans la différenciation terminale des érythroblastes et plusieurs études ont montré que, lors de l'énucléation, Emp/MAEA ségrége avec le pyrénocyte (Bell *et al*., 2013; Hanspal *et al*., 1998), nous pensions donc observer un marquage constant, voire même plus intense, des cellules à J+17, puisqu'à ce temps, les cellules sont plus matures (10% d'érythroblastes acidophiles en moyenne). Pourtant la diminution des RFI est observée de façon répétée ce qui semble exclure la possibilité d'un artéfact. Même si cette diminution pourrait être en partie expliquée par la réduction de la taille cellulaire au cours de l'érythrpoïèse, nous avons également recherché une corrélation entre les valeurs de $RFI_{Emp/MAEA}$ et nos marqueurs de différenciation. Aucune corrélation n'est observée ni avec l'expression de la glycophorine A ou des hémoglobines fœtale et adulte, ni avec la proportion de cellules matures (érythroblastes polychromatophiles et acidophiles). Par contre, une corrélation positive très forte et statistiquement significative (test de corrélation de rang de Spearman, $\rho > 0,9$ avec $p < 0,001$) est mise en évidence avec le

pourcentage de cellules de la lignée myélomonocytaire comptées sur les colorations MGG de nos cultures.

Cette observation suggère que l'expression et le maintien de l'Emp/MAEA à la membrane des érythroblastes sont dépendant de la présence de la lignée myélomonocytaire. Pour confirmer cette hypothèse, nous envisageons d'utiliser des modèles de co-culture macrophages/érythroblastes issus du même donneur. Il a été montré que la présence des macrophages augmente le transcrit de la chaine gamma (Υ) de globine sans affecter l'expression de la GYPA, du CD44, du CD117 ni de la bande 3 mais l'expression de Emp/MAEA n'a pas été étudiée (Cokic *et al*., 2009; Ramos *et al*., 2013). De plus, pour définir si le contact entre les cellules est nécessaire nous utiliserons des cultures sur système avec inserts de type Transwell® et les co-cultures directes (avec contact).

Enfin, comme la protéine Emp/MAEA joue un rôle dans l'énucléation, des modèles de cultures permettant une énucléation plus efficace peuvent être envisagés pour mieux comprendre le rôle d'Emp/MAEA dans ce mécanisme. Notre modèle est un modèle en deux dimensions, et de ce fait, relativement éloigné du modèle physiologique. De nouveaux modèles de culture en trois dimension ou même quatre dimensions seraient plus adaptés (Hilderbrand *et al*., 2016; Lee *et al*., 2015). Ils permettraient de recréer un microenvironnement, avec une matrice extracellulaire, des co-cultures associées et donc des communications intercellulaires.

Conclusion

La demande croissante de transfusions sanguines ainsi que la pénurie d'approvisionnement en sang représentent un problème émergent important en médecine transfusionnelle. Cette problématique est exacerbée dans le cas des populations migrantes, notamment les populations originaires d'Afrique sub-saharienne qui présentent des caractéristiques phénotypiques spécifiques et une fréquence élevée de pathologies requérant des transfusions itératives comme la drépanocytose ou la thalassémie. La pénurie de sang provenant de donneurs compatibles et le risque d'infection ont créé des limites dans la disponibilité quantitative et qualitative des globules rouges pour la transfusion.

La recherche d'une alternative au don volontaire de sang est donc un enjeu majeur de santé publique. Plusieurs pistes sont explorées comme l'obtention de HSPC à partir de cellules souches embryonnaires humaines (CSE) ou d'iPSCs (*induced pluripotent stem cells*) qui sont, par définition, des cellules souches auto-renouvelables et immortelles pouvant donner naissance à n'importe quel type cellulaire {Shah et al 2014}. La génération de lignées cellulaires capables de se différencier en globules rouges est également explorée. Récemment, la lignée cellulaire BEL-A a montré le grand potentiel de ces lignées immortalisées comme un outil de recherche pour l'étude de l'érythropoïèse. Cependant, le comportement de ces cellules sur le moyen et long terme reste inconnu (instabilité génétique){Trakarnsanga *et al* 2017}. La possibilité de reproduire l'érythropoïèse humaine *in vitro* à partir de cellules $CD34^+$ isolées de sangs de cordon humains ou de sang périphérique mobilisé par G-CSF obtenus de volontaires sains ouvre de nouvelles perspectives. Ces deux sources de CSH ont montré des résultats équivalents en termes de taux de prolifération et de capacités de différenciation avec production de cellules qui présentent les mêmes changements morphologiques et immunophénotypiques bien qu'elles montrent des caractéristiques différentes dans les niveaux d'expression génique et la production de sous-type d'hémoglobine. Les cellules $CD34^+$ issues de sangs de cordon ou de sang périphérique ne sont pas immortelles et ne peuvent donc pas constituer une source indéfinie de globules rouges pour les patients qui ont besoin de transfusions toutes les trois ou quatre semaines. Dans l'optique de produire des globules rouges par culture cellulaire, l'objectif est aujourd'hui de tenter de concilier deux propriétés : la grande capacité de prolifération des CSH de sang de cordon et l'aptitude des précurseurs érythroïdes issus de moelle osseuse à achever *in vitro* leur maturation jusqu'au stade d'érythrocytes énucléés.

Chez la souris, la protéine Emp/MAEA est un acteur majeur de l'érythropoïèse terminale, et joue notamment un rôle déterminant au cours de l'énucléation. Nos résultats, issus d'un modèle de culture 2D de cellules $CD34^+$ humaines, suggèrent non seulement que la localisation d'Emp/MAEA est régulée au cours de l'érythropoïèse, mais surtout que cette régulation dépend de la présence d'un autre type cellulaire. Ceci souligne l'importance du dialogue entre les cellules dans les mécanismes de différenciation et met en exergue l'intérêt d'étudier l'érythropoïèse non plus comme un processus isolé impliquant uniquement des érythroblastes, mais plutôt de l'envisager en interaction avec son environnement. Chez l'homme l'érythropoïèse physiologique se déroule dans la moelle osseuse au sein des îlots érythroblastiques, composés d'un macrophage central interagissant *via* la molécule Emp/MAEA, entre autre, avec des érythroblastes à différents stades. Ces îlots sont eux-mêmes situés dans un microenvironnement médullaire appelé niche et composé d'une matrice extracellulaire, de facteurs solubles et de différents types cellulaires (cellules stromales, fibroblastes, cellules endothéliales, adipocytes, ostéoblastes et cellules du système immunitaire). La matrice extracellulaire permet l'ancrage des différents types cellulaires et se comporte comme un lieu de stockage pour les cytokines et les facteurs de croissance, les rendant ainsi accessibles aux cellules. Au sein de la niche les différents types cellulaires peuvent donc établir des interactions directes (l'îlot érythroblastique par exemple) mais également influer les uns sur les autres *via* des mécanismes autocrines et paracrines. L'étude des différentes composantes de la niche et des facteurs sécrétés est une piste intéressante pour expliquer dans un premier temps la régulation d'Emp/MAEA, mais surtout, à terme pour mieux comprendre le processus d'érythropoïèse et identifier les acteurs clés de la maturation des globules rouges. On peut ainsi envisager à terme de mettre à la disposition des cellules souches, des progéniteurs et des précurseurs, les molécules nécessaires à la prolifération, à la différenciation et à l'énucléation des cellules érythroïdes.

Bibliographie

Adams, J.C. (2002). Characterization of a Drosophila melanogaster orthologue of muskelin. Gene 297, 69-78.

d'Allard, D. (2013). Erythropoîèse normale et pathologique, internalisation de c-Kit et morphologie du nucléole. Thèse de doctorat Université Paris Descartes, 5 p.

Bala, S., Kumar, A., Soni, S., Sinha, S., and Hanspal, M. (2006). Emp is a component of the nuclear matrix of mammalian cells and undergoes dynamic rearrangements during cell division. Biochem Biophys Res Commun 342, 1040-1048.

Bauer, D.E., Kamran, S.C., and Orkin, S.H. (2012). Reawakening fetal hemoglobin: prospects for new therapies for the beta-globin disorders. Blood 120, 2945-2953.

Bell, A.J., Satchwell, T.J., Heesom, K.J., Hawley, B.R., Kupzig, S., Hazell, M., Mushens, R., Herman, A., and Toye, A.M. (2013). Protein distribution during human erythroblast enucleation in vitro. PLoS One 8, e60300.

Bessis, M. (1958). [Erythroblastic island, functional unity of bone marrow]. Rev Hematol 13, 8-11.

Birkmann, J., Oez, S., Smetak, M., Kaiser, G., Kappauf, H., and Gallmeier, W.M. (1997). Effects of recombinant human thrombopoietin alone and in combination with erythropoietin and early-acting cytokines on human mobilized purified CD34+ progenitor cells cultured in serum-depleted medium. Stem Cells 15, 18-32.

Chasis, J.A. (2006). Erythroblastic islands: specialized microenvironmental niches for erythropoiesis. Curr Opin Hematol 13, 137-141.

Chasis, J.A., and Mohandas, N. (2008). Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. Blood 112, 470-478.

Cho, Y.S., Chen, C.H., Hu, C., Long, J., Ong, R.T., Sim, X., Takeuchi, F., Wu, Y., Go, M.J., Yamauchi, T., et al. (2011). Meta-analysis of genome-wide association studies identifies eight new loci for type 2 diabetes in east Asians. Nat Genet 44, 67-72.

Chow, A., Lucas, D., Hidalgo, A., Mendez-Ferrer, S., Hashimoto, D., Scheiermann, C., Battista, M., Leboeuf, M., Prophete, C., van Rooijen, N., et al. (2011). Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. J Exp Med 208, 261-271.

Cokic, V.P., Beleslin-Cokic, B.B., Smith, R.D., Economou, A.P., Wahl, L.M., Noguchi, C.T., and Schechter, A.N. (2009). Stimulated stromal cells induce gamma-globin gene expression in erythroid cells via nitric oxide production. Exp Hematol 37, 1230-1237.

Courtois G., Vandekerckhove J., Dussiot M., Kersual J., Coulon S., Belaid Z., Zermati Y., Ribeil J.A., Hermine O. (2007). L'érythropoïèse tardive : une mort avortée ?. Hématologie 13, 400-408

Dolznig, H., Habermann, B., Stangl, K., Deiner, E.M., Moriggl, R., Beug, H., and Mullner, E.W. (2002). Apoptosis protection by the Epo target Bcl-X(L) allows factor-independent differentiation of primary erythroblasts. Curr Biol 12, 1076-1085.

Fajtova, M., Kovarikova, A., Svec, P., Kankuri, E., and Sedlak, J. (2013). Immunophenotypic profile of nucleated erythroid progenitors during maturation in regenerating bone marrow. Leuk Lymphoma 54, 2523-2530.

Francis, O., Han, F., and Adams, J.C. (2013). Molecular phylogeny of a RING E3 ubiquitin ligase, conserved in eukaryotic cells and dominated by homologous components, the muskelin/RanBPM/CTLH complex. PLoS One 8, e75217.

Gautier, E.F., Ducamp, S., Leduc, M., Salnot, V., Guillonneau, F., Dussiot, M., Hale, J., Giarratana, M.C., Raimbault, A., Douay, L., et al. (2016). Comprehensive Proteomic Analysis of Human Erythropoiesis. Cell Rep 16, 1470-1484.

Georgin, P. et Gouet, M. (2000). Statistiques avec Excel 2000, édition Eyrolles, Paris

Hanspal, M., and Hanspal, J.S. (1994). The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: a 30-kD heparin-binding protein is involved in this contact. Blood 84, 3494-3504.

Hanspal, M., Smockova, Y., and Uong, Q. (1998). Molecular identification and functional characterization of a novel protein that mediates the attachment of erythroblasts to macrophages. Blood 92, 2940-2950.

Hilderbrand, A.M., Ovadia, E.M., Rehmann, M.S., Kharkar, P.M., Guo, C., and Kloxin, A.M. (2016). Biomaterials for 4D stem cell culture. Curr Opin Solid State Mater Sci 20, 212-224.

Hu, J., Liu, J., Xue, F., Halverson, G., Reid, M., Guo, A., Chen, L., Raza, A., Galili, N., Jaffray, J., et al. (2013). Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. Blood 121, 3246-3253.

Imamura, M., Maeda, S., Yamauchi, T., Hara, K., Yasuda, K., Morizono, T., Takahashi, A., Horikoshi, M., Nakamura, M., Fujita, H., et al. (2012). A single-nucleotide polymorphism in ANK1 is associated with susceptibility to type 2 diabetes in Japanese populations. Hum Mol Genet 21, 3042-3049.

Jacobsen, R.N., Perkins, A.C., and Levesque, J.P. (2015). Macrophages and regulation of erythropoiesis. Curr Opin Hematol 22, 212-219.

Javan, G.T., Can, I., Yeboah, F., Lee, Y., and Soni, S. (2016). Novel interactions between erythroblast macrophage protein and cell migration. Blood Cells Mol Dis 60, 24-27.

Ji, M., Li, H., Suh, H.C., Klarmann, K.D., Yokota, Y., and Keller, J.R. (2008). Id2 intrinsically regulates lymphoid and erythroid development via interaction with different target proteins. Blood 112, 1068-1077.

Jin, H., Kim, H.S., Kim, S., and Kim, H.O. (2014). Erythropoietic potential of CD34+ hematopoietic stem cells from human cord blood and G-CSF-mobilized peripheral blood. Biomed Res Int 2014, 435215.

Kobayashi, I., Ubukawa, K., Sugawara, K., Asanuma, K., Guo, Y.M., Yamashita, J., Takahashi, N., Sawada, K., and Nunomura, W. (2016). Erythroblast enucleation is a dynein-dependent process. Exp Hematol 44, 247-256 e212.

Konstantinidis, D.G., Pushkaran, S., Johnson, J.F., Cancelas, J.A., Manganaris, S., Harris, C.E., Williams, D.A., Zheng, Y., and Kalfa, T.A. (2012). Signaling and cytoskeletal requirements in erythroblast enucleation. Blood 119, 6118-6127.

Lee, E., Han, S.Y., Choi, H.S., Chun, B., Hwang, B., and Baek, E.J. (2015). Red blood cell generation by three-dimensional aggregate cultivation of late erythroblasts. Tissue Eng Part A 21, 817-828.

Lee, S.H., Crocker, P.R., Westaby, S., Key, N., Mason, D.Y., Gordon, S., and Weatherall, D.J. (1988). Isolation and immunocytochemical characterization of human bone marrow stromal macrophages in hemopoietic clusters. J Exp Med 168, 1193-1198.

Leonard, M., Brice, M., Engel, J.D., and Papayannopoulou, T. (1993). Dynamics of GATA transcription factor expression during erythroid differentiation. Blood 82, 1071-1079.

Macri, S., Pavesi, E., Crescitelli, R., Aspesi, A., Vizziello, C., Botto, C., Corti, P., Quarello, P., Notari, P., Ramenghi, U., et al. (2015). Immunophenotypic Profiling of Erythroid Progenitor-Derived Extracellular Vesicles in Diamond-Blackfan Anaemia: A New Diagnostic Strategy. PLoS One 10, e0138200.

Mao, X., Shi, X., Liu, F., Li, G., and Hu, L. (2013). Evaluation of erythroblast macrophage protein related to erythroblastic islands in patients with hematopoietic stem cell transplantation. Eur J Med Res 18, 9.

Mouthon, M.A., Bernard, O., Mitjavila, M.T., Romeo, P.H., Vainchenker, W., and Mathieu-Mahul, D. (1993). Expression of tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis. Blood 81, 647-655.

Nagai, T., Harigae, H., Ishihara, H., Motohashi, H., Minegishi, N., Tsuchiya, S., Hayashi, N., Gu, L., Andres, B., Engel, J.D., et al. (1994). Transcription factor GATA-2 is expressed in erythroid, early myeloid, and CD34+ human leukemia-derived cell lines. Blood 84, 1074-1084.

Ohneda, K., and Yamamoto, M. (2002). Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage. Acta Haematol 108, 237-245.

Ouaissi, M., Silvy, F., Loncle, C., Ferraz da Silva, D., Martins Abreu, C., Martinez, E., Berthezene, P., Cadra, S., Le Treut, Y.P., Hardwigsen, J., et al. (2014). Further characterization of HDAC and SIRT gene expression patterns in pancreatic cancer and their relation to disease outcome. PLoS One 9, e108520.

Pevny, L., Simon, M.C., Robertson, E., Klein, W.H., Tsai, S.F., D'Agati, V., Orkin, S.H., and Costantini, F. (1991). Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. Nature 349, 257-260.

Pourcher, G., Mazurier, C., King, Y.Y., Giarratana, M.C., Kobari, L., Boehm, D., Douay, L., and Lapillonne, H. (2011). Human fetal liver: an in vitro model of erythropoiesis. Stem Cells Int 2011, 405429.

Ramos, P., Casu, C., Gardenghi, S., Breda, L., Crielaard, B.J., Guy, E., Marongiu, M.F., Gupta, R., Levine, R.L., Abdel-Wahab, O. (2013). Macrophages support pathological erythropoiesis in polycythemia vera and beta-thalassemia. Nat Med 19, 437-445.

Shah, S., Huang X. and Cheng L. (2014). Concise Review: Stem Cell-Based Approaches to Red Blood Cell Production for Transfusion. Stem Cells Transl Med 3, 346–355.

Soni, S., Bala, S., Gwynn, B., Sahr, K.E., Peters, L.L., and Hanspal, M. (2006). Absence of erythroblast macrophage protein (Emp) leads to failure of erythroblast nuclear extrusion. J Biol Chem 281, 20181-20189.

Soni, S., Bala, S., and Hanspal, M. (2008). Requirement for erythroblast-macrophage protein (Emp) in definitive erythropoiesis. Blood Cells Mol Dis 41, 141-147.

Soni, S., Bala, S., Kumar, A., and Hanspal, M. (2007). Changing pattern of the subcellular distribution of erythroblast macrophage protein (Emp) during macrophage differentiation. Blood Cells Mol Dis 38, 25-31.

Thom, CS., Traxler, EA., Khandros, E., Nickas, JM., Zhou, O., Lazarus, JE., Silva, AP., Prabhu, D., Yao, Y., aribeana, C., Fuchs, SY., Mackay, JP., Holzbaur, E. and Weiss, MJ. (2014). Trim58 degrades Dynein and regulates terminal erythropoiesis. Dev cell 6, 688-700

Trakarnsanga, K., Griffiths, RE., Wilson, MC., Blair, A., Satchwell, TJ.,Meinders, M., Cogan, N., Kupzig, S., Kurita, R., Nakamura, Y., Toye, AM., Anstee, DJ. and Frayne J. (2016). An immortalized adult human erythroid line facilitates sustainable and scalable generation of functional red cells. Nat Commun. 14;8:14750

Weiss, M.J., Keller, G., and Orkin, S.H. (1994). Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. Genes Dev *8*, 1184-1197.

Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., and Lodish, H.F. (1995). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. Cell *83*, 59-67.

Yoshida, K., Sunazuka, T., Nagai, K., Sugawara, A., Cho, A., Nagamitsu, T., Harigaya, Y., Otoguro, K., Akagawa, K.S., and Omura, S. (2005). Macrolides with promotive activity of monocyte to macrophage differentiation. J Antibiot (Tokyo) *58*, 79-81.

Zermati, Y., Fichelson, S., Valensi, F., Freyssinier, J.M., Rouyer-Fessard, P., Cramer, E., Guichard, J., Varet, B., and Hermine, O. (2000). Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors. Exp Hematol *28*, 885-894.