

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

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

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

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

Reçu le 12 mai 2005

RÉSUMÉ

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

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

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

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

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

INTRODUCTION

L'érythropoïèse est un processus complexe qui aboutit à la formation de $100 \cdot 10^9$ globules rouges par jour. Elle a lieu chez l'adulte dans la moelle osseuse. La production de globules rouges dépend du taux d'apoptose des progéniteurs et des précurseurs érythroïdes. Elle est finement régulée pour permettre d'adapter la production aux besoins en oxygène des tissus périphériques. Récemment nous avons mis en évidence que l'activation d'une enzyme impliquée lors de l'apoptose, la caspase-3, est également indispensable aux modifications morphologiques caractéristiques observées au cours de la différenciation érythroïde terminale chez l'Homme (Zermati *et al.*, 2001). Dans ce contexte de différenciation, bien que la caspase-3 soit activée, il n'y a ni apoptose ni clivage du facteur de transcription GATA-1 qui est indispensable à la différenciation érythroïde terminale. L'objet de cette revue est de discuter, à travers le modèle de différenciation érythroïde terminale, les mécanismes physiologiques de différenciation cellulaire faisant intervenir les caspases.

L'ÉRYTHROPOÏÈSE : GÉNÉRALITÉS

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

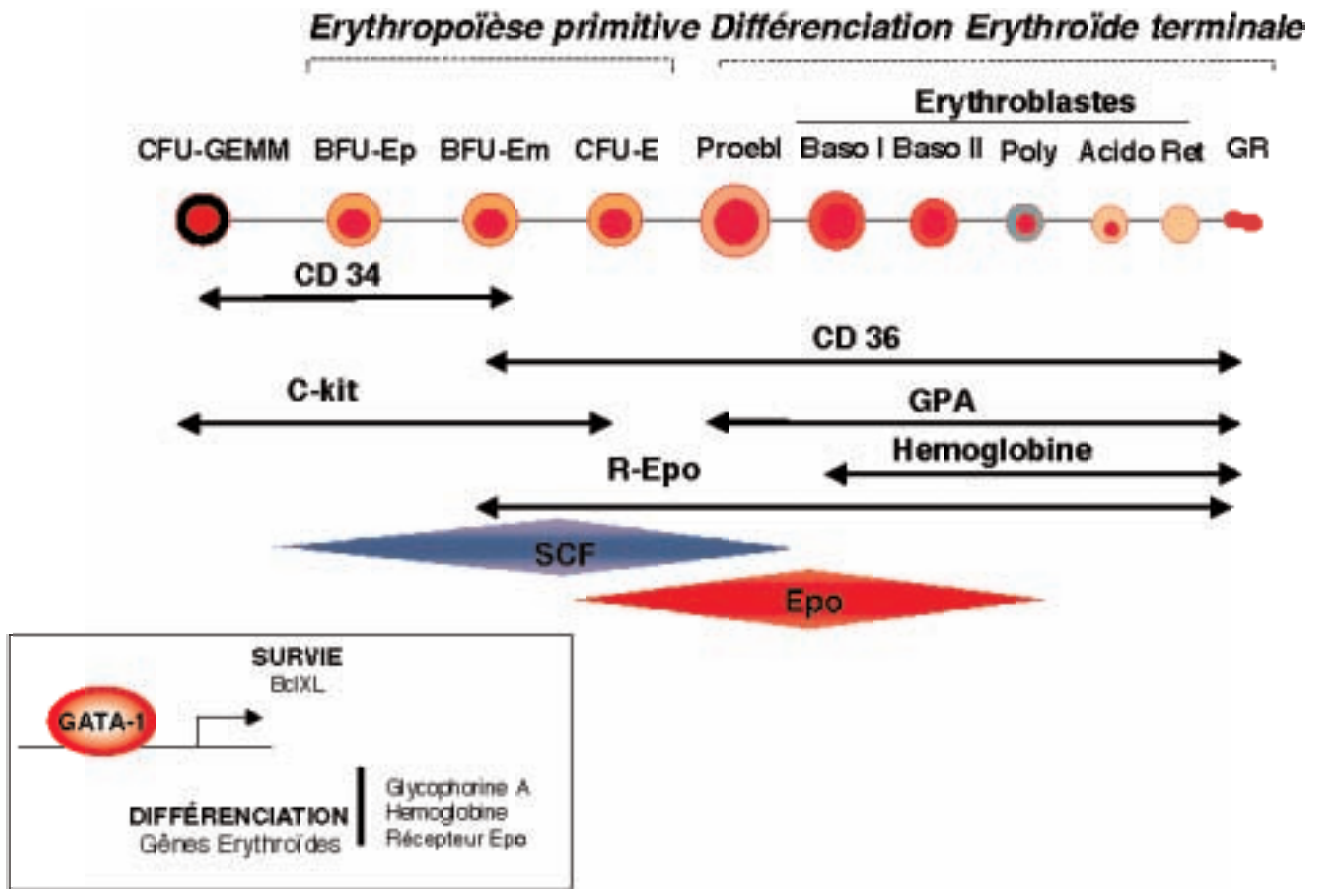


FIG. 1. –Schéma de l'érythropoïèse.

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

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

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

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

CYTOKINES RÉGULANT POSITIVEMENT L'ÉRYTHROPOÏÈSE

Stem Cell Factor

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

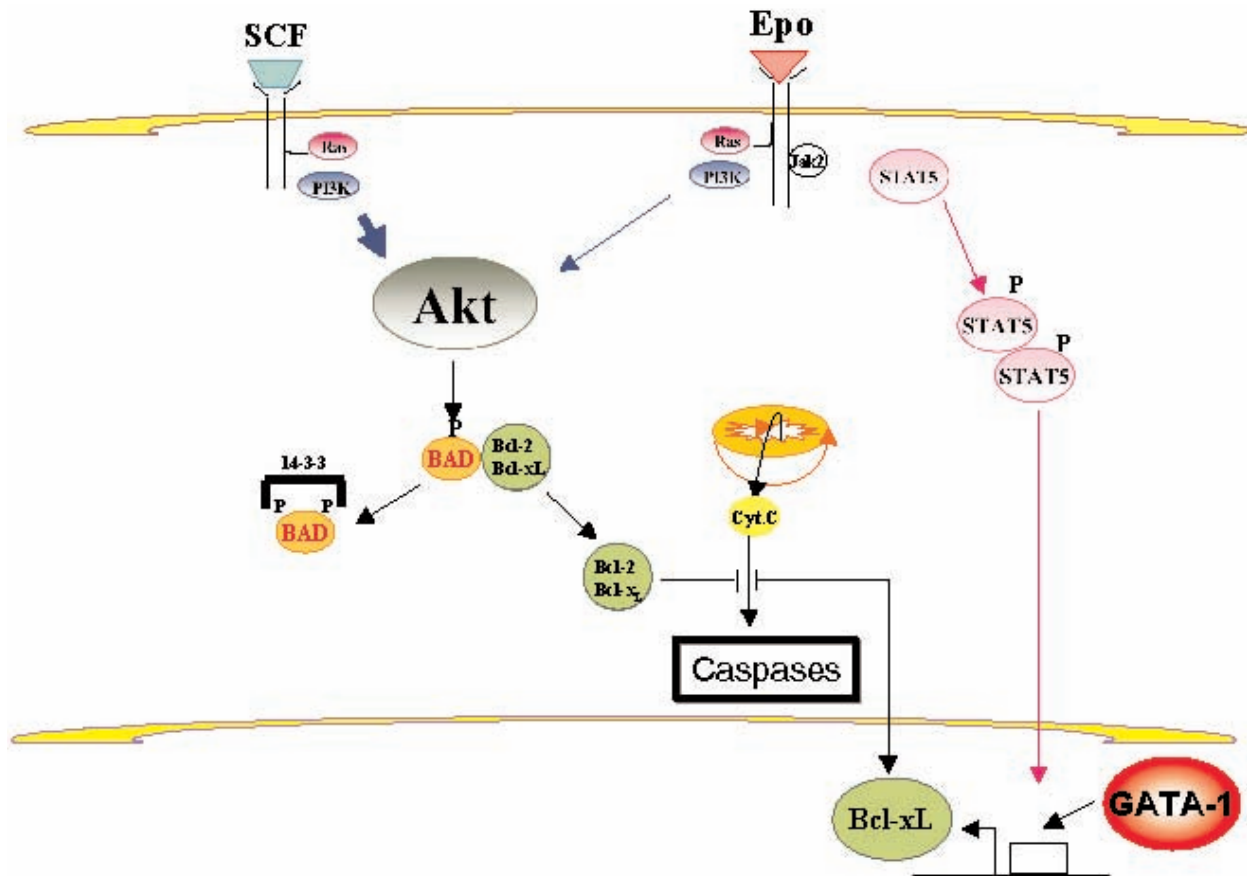


FIG. 2. – Synergie entre EPO et SCF pour la survie cellulaire.

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

Érythropoïétine

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

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

Régulation de la synthèse d'EPO par les cellules rénales

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

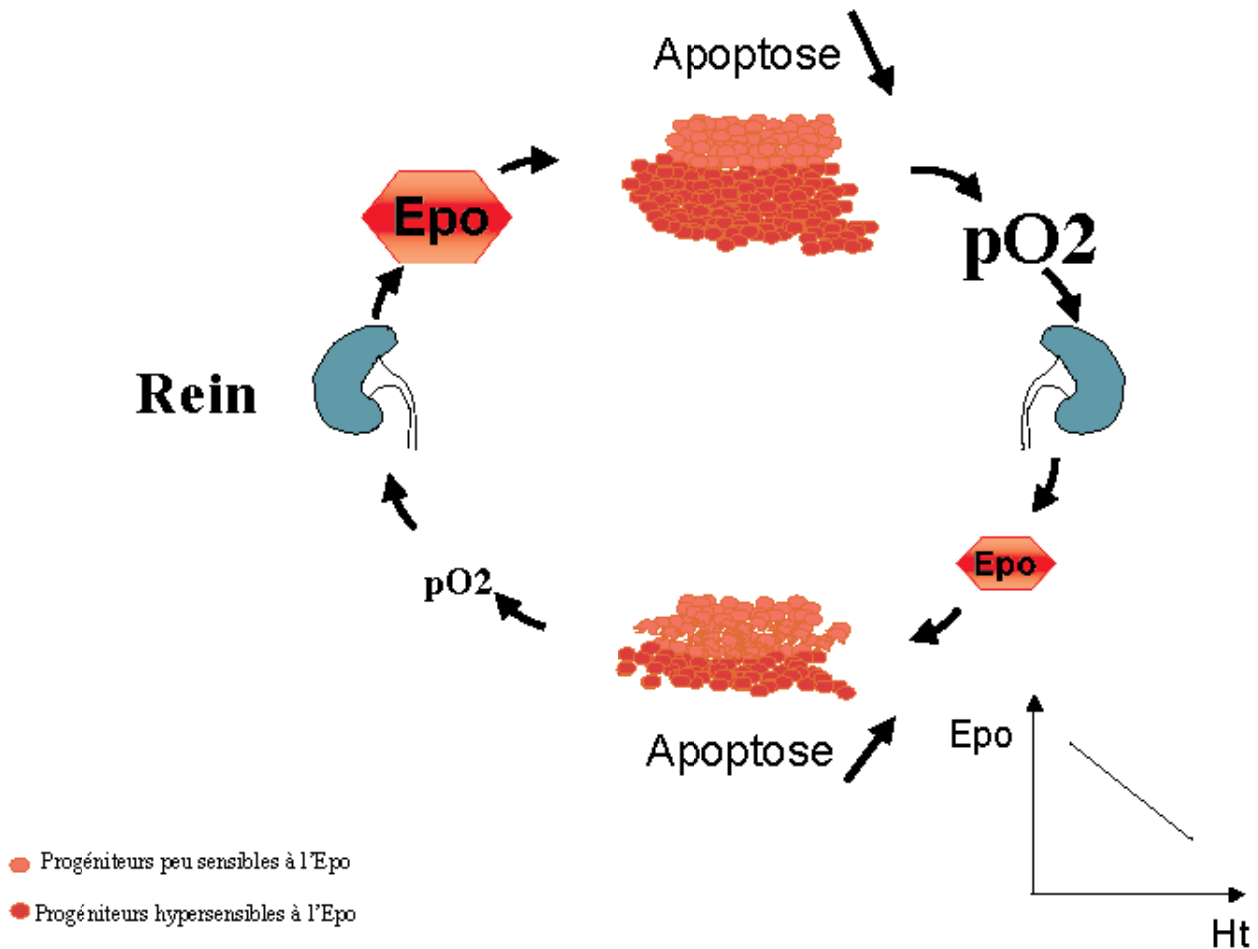


FIG. 3. – Régulation endocrine de l'érythropoïèse.

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

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

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

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

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

RÔLE DES CASPASES DANS L'ÉRYTHROPOÏÈSE

Rôle des caspases dans la régulation négative de l'érythropoïèse

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

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

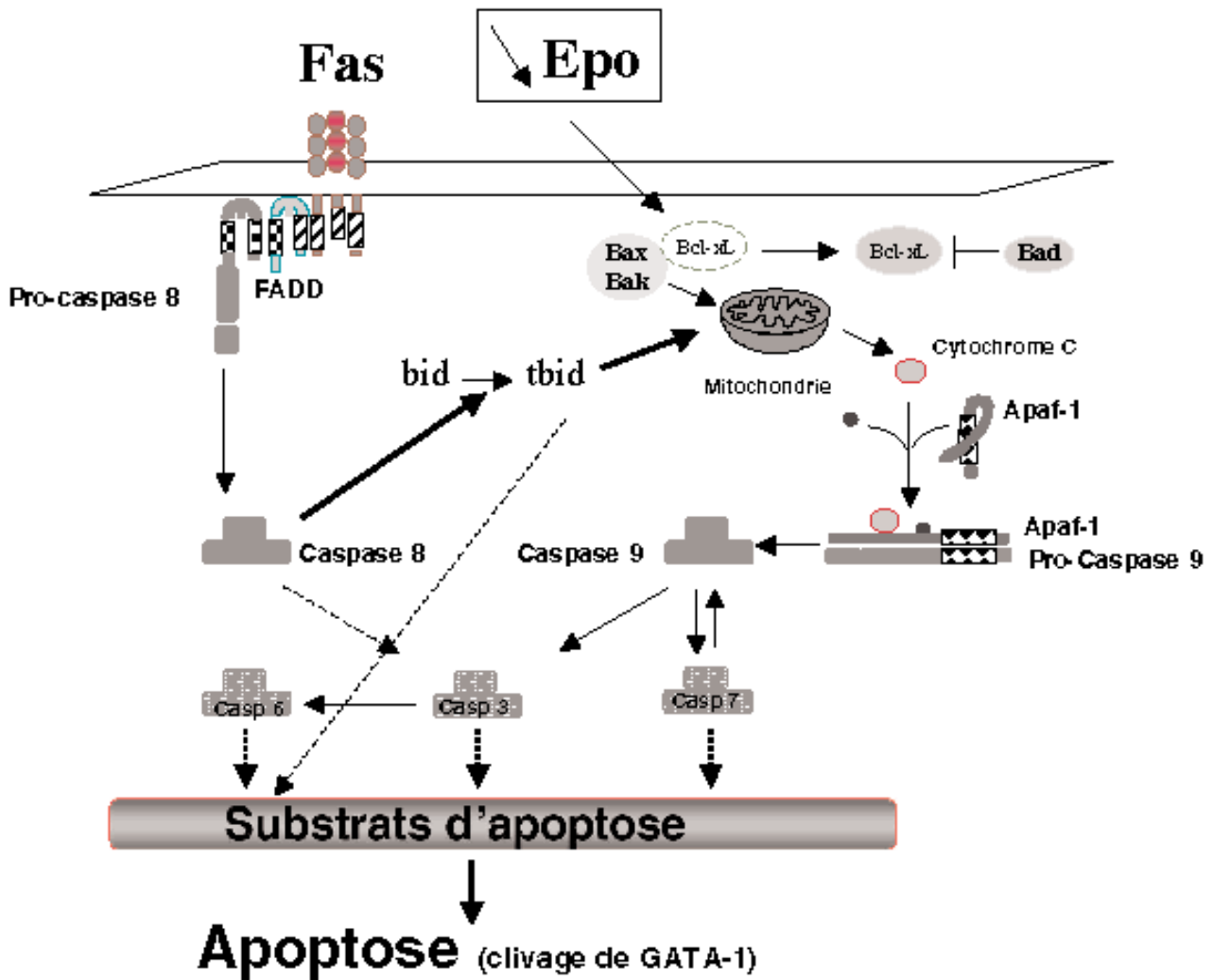


FIG. 4. – Mécanismes d'activation des caspases en l'absence d'EPO, ou en présence de Fas.

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

Rôle des caspases dans la maturation terminale des érythroblastes

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

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

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

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

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

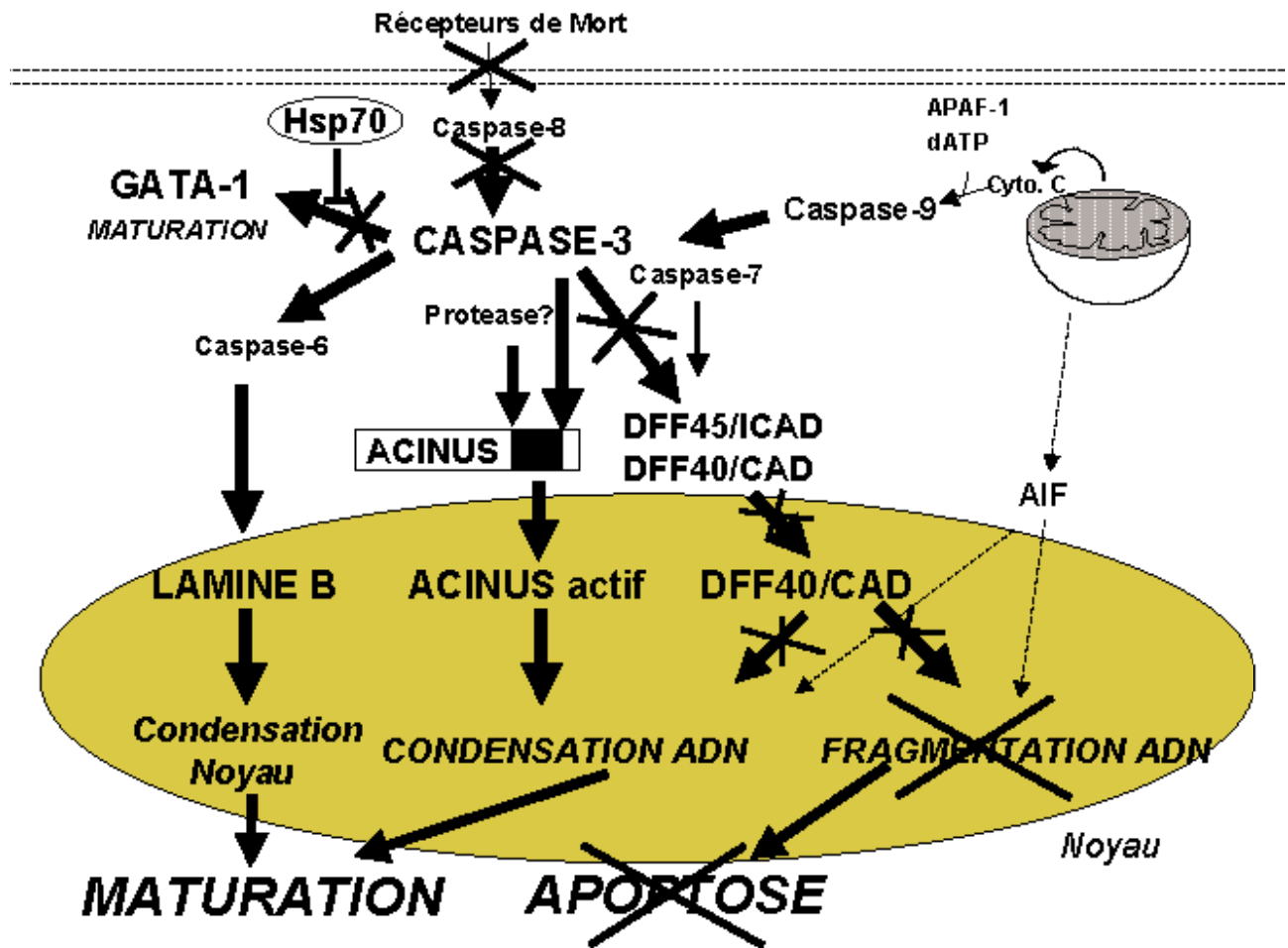


FIG. 5. – Rôle des caspases dans la maturation des érythroblastes. L'absence de clivage d'ICAD et de GATA-1 détermine le devenir de l'érythroblaste entre maturation et apoptose.

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

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

Rôle des caspases dans le système immunitaire

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

Rôle des caspases dans la différenciation des monocytes en macrophages

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

Rôle des caspases dans la différenciation mégacaryocytaire

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

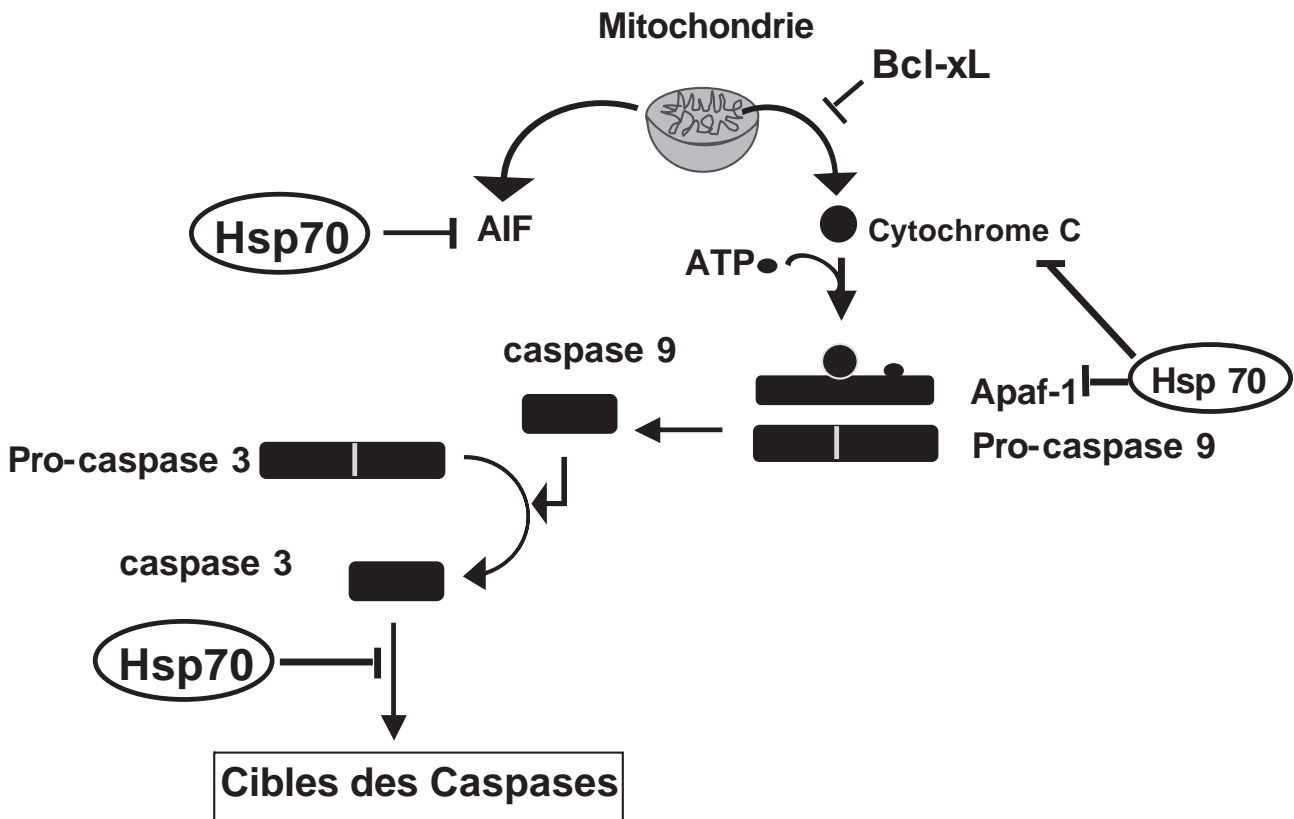


FIG. 6. – Rôle anti-apoptotique d'Hsp70.

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

CONCLUSION

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

BIBLIOGRAPHIE

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

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

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