



THÈSE DE DOCTORAT DE L'ÉTABLISSEMENT UNIVERSITÉ BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ
PRÉPARÉE À L'UFR DES SCIENCES DE SANTÉ

École doctorale n° 554

École Doctorale Environnements-Santé-E2S

Doctorat de cancérologie, génétique, hématologie, immunologie

par

Mr CAMPARIO Hugo

Rôle du facteur de transcription *hsf1* dans l'érythropoïèse du poisson zèbre

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 12 Mai 2020

Composition du Jury :

Mr LEVRAUD Jean-Pierre DR1, Institut Pasteur, Paris

Mme GARDIE Betty MC-EPHE, Unité de Recherche de l'Institut du Thorax, Nantes

Mr GIRODON François PUPH, Hôpital Universitaire François-Mitterrand, Dijon

Mme CHLUBA Johanna PR, INSERM UMR1231, Dijon

Président & Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse

Co-encadrante de thèse

Titre : Rôle du facteur de transcription *hsf1* dans l'érythropoïèse du poisson zèbre

Mots clés : Érythropoïèse, HSF1, CRISPR/Cas9, poisson zèbre

Résumé : Il a été démontré que les protéines de choc thermique (HSP) jouent un rôle important dans l'érythropoïèse. Or, l'expression des gènes HSP est contrôlée par le facteur de choc thermique 1 (HSF1), un facteur de transcription hautement conservé. Jusqu'à présent, une compréhension détaillée de la fonction d'HSF1 dans l'érythropoïèse reste à établir. Dans notre étude, nous avons utilisé le poisson zèbre, modèle animal pertinent, pour étudier le rôle du gène *hsf1* pendant l'érythropoïèse embryonnaire. Nous avons établi des lignées de poisson-zèbre invalidées pour le gène *hsf1* en utilisant la technologie CRISPR/Cas9 et nous avons effectué des analyses phénotypiques tout au long de l'embryogenèse.

Nous avons constaté que les embryons déficients en Hsf1 ont un nombre réduit d'érythrocytes primitifs, alors que le nombre d'érythrocytes chez les poissons zèbres adultes reste inchangé. L'expression des gènes embryonnaires des chaînes α et β -globines est réduite ainsi que l'expression de *gata1*. De plus, la morphologie des érythrocytes révèle une inhibition de la maturation des érythrocytes. En revanche, aucun changement significatif n'a été observé dans les cellules myéloïdes. Nos résultats montrent que le gène *hsf1* est un régulateur positif de la maturation des érythrocytes in vivo.

Title : The role of the transcription factor *hsf1* in zebrafish erythropoiesis

Keywords : Erythropoiesis, HSF1, CRISPR/Cas9, zebrafish

Abstract : Heat shock proteins (HSPs) are reported to play an important role in erythropoiesis. The expression of HSP genes is mainly controlled by Heat shock factor 1 (HSF1), a highly conserved transcription factor. So far, a detailed understanding of the function of HSF1 in erythropoiesis remains uncharacterized. This study has employed zebrafish as a relevant model to investigate the role of Hsf1 during embryonic erythropoiesis. We established *hsf1*-disrupted zebrafish lines using the CRISPR/Cas9 technology and performed phenotypic analyses throughout embryogenesis.

We found that Hsf1 deficient embryos had a decreased number of primitive erythrocytes, while erythrocyte number in adults was unchanged. In Hsf1 deficient embryos, expression of embryonic α and β globin genes was reduced as well as *gata1* expression. In addition, the morphology of erythrocytes suggested an inhibition of erythrocyte maturation. On the other hand, no significant changes were observed in myeloid cells. Altogether our results support a key role for Hsf1 in erythrocyte maturation in vivo.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer ce travail.

Je remercie vivement le **Docteur Betty Gardie** et le **Docteur Jean-Pierre Levraud** d'avoir accepté d'en être les rapporteurs et d'avoir été également des appuis appréciables à des moments déterminants : le **Docteur Betty Gardie** pour ses conseils avisés lors de nos visioconférences au début du projet sur les érythrocytoses idiopathiques ; le **Docteur Jean-Pierre Levraud** pour m'avoir permis d'utiliser l'animalerie de poisson zèbre de l'Institut Pasteur au cours d'une journée pour essayer de comprendre la perte d'efficacité de notre morpholino dans nos poissons zèbres.

Je remercie chaleureusement mon directeur de thèse, le **Professeur François Girodon**, de m'avoir accueilli, il y a cinq ans, à Dijon et de m'avoir fait confiance en me proposant de travailler avec lui sur les érythrocytoses idiopathiques. Même si nous ne nous voyions pas toutes les semaines en raison de son activité hospitalière et de la localisation de mon bureau dans un autre bâtiment que le sien, il a toujours répondu présent lorsque j'avais besoin de lui. Qu'il soit remercié pour son encadrement, sa pédagogie, ses précieux conseils et sa bienveillance à mon égard, reconnue et appréciée de tous les étudiants.

Je remercie sincèrement ma co-directrice de thèse, le **Professeur Johanna Chluba** pour m'avoir permis de découvrir le modèle du poisson zèbre et pour son encadrement patient et stimulant au quotidien. A ses côtés, j'aurai gagné en ténacité et appris à ne pas lâcher malgré l'adversité aussi bien technique que matérielle rencontrée durant ces quatre années.

Un grand merci à **Benoist Pruvot**, sans lequel tout ce travail n'aurait certainement pas été possible. Qu'il soit remercié de m'avoir encadré, aiguillé, supporté et soutenu dans les nombreux moments de doute. Merci pour ces échanges nombreux, aussi bien scientifiques que culturels.

Merci à **Leticia**, pour son travail au quotidien au sein de l'animalerie et pour nous avoir permis de remonter la pente pour ma dernière année de thèse. Qu'elle soit remerciée de sa disponibilité et de son aide, notamment les derniers mois dans les manip quand il a fallu passer la 5ème pour sortir les résultats finaux.

Je remercie également l'ensemble du personnel de **Cellimap**, notamment **André** pour sa patience et son aide dans l'utilisation de l'Axio zoom et de **la plateforme de cytométrie**, avec **Anabelle, Serge et Nicolas** qui m'ont aidé à calibrer ces diables de SSC et FSC.

Je remercie enfin l'ensemble de l'unité INSERM 1231 pour son accueil et notamment mes co-étudiants de M2R devenus co-doctorants **Gaëtan, Marine, Burhan, Kilian** et les plus jeunes **Lenny, Steven, Vincent**.

Je n'oublie pas bien sûr l'**ensemble des personnes rencontrées au cours de mes études** et qui sont devenues et restées mes amis : rencontres marquantes des années de lycéen, d'étudiant puis d'interne en pharmacie et rencontres stimulantes dans le cadre de mes engagements associatifs. Qu'ils soient remerciés de leur fidélité et de leurs encouragements. Ils se reconnaîtront.

Un merci à **mes colocs** dont la compagnie joyeuse a égayé ces dernières années, parfois éprouvantes : Bastian alias Grand Chef, Simon alias Kenny, Pauline alias TC (& Stephen & Charles) et Marion alias MC (& Julian). Merci pour les soirées jeux, les poubelles de Tota, les soirées GOT, les drives, les repas de Bocuse, les nombreux moments d'échanges.

Mes derniers remerciements iront à ma **famille**. À mes parents, Sylvie et Jean-Luc, qui m'ont toujours soutenu et accompagné dans mes choix, à mes deux sœurs, Lisa (Oleg & Viktor) et Elena (& Etienne) qui ont toujours corrigé avec patience mes présentations en anglais, et à mes grands-parents, Yves et Éliette, qui ont toujours été présents pour me soutenir durant mes (trop) longues études. Et pour finir, Justine, mon amour, merci de tes conseils avisés et de ton soutien au jour le jour malgré l'éloignement. Je suis impatient de te rejoindre à Paris.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	1
TABLE DES MATIÈRES	3
LISTE DES ANNEXES	6
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX.....	8
LISTE DES ABREVIATIONS	9
ÉTAT DE L'ART.....	9
I. LE POISSON ZEBRE : UN ORGANISME MODELE	10
I.1 Généralités.....	10
I.2 Les principales étapes du développement du poisson zèbre	11
I.3 Le poisson zèbre : un modèle génétique	12
I.3.1 Le génome du poisson zèbre	12
I.3.2 Invalidation de gènes par le système CRISPR/Cas9	13
II. HEMATOPOÏÈSE.....	15
II.1 Hématopoïèse chez le poisson-zèbre versus mammifères.....	15
II.1.1 Hématopoïèse primitive (embryonnaire)	15
II.1.2 Hématopoïèse définitive (adulte)	18
II.2 Érythropoïèse.....	20
II.2.1 Érythrocytes.....	20
II.2.2 Hémoglobine	22
II.2.3 Les facteurs régulateurs de l'érythropoïèse	23
II.2.3.1 GATA 1.....	23
II.2.3.2 Autres facteurs érythroïdes.....	26
II.2.3.3 Érythropoïétine	27
II.3 Mutants érythropoïétiques de poissons zèbres et maladies humaines associées.....	28
III. HSF1 ET LA REPONSE AU STRESS THERMIQUE.....	31
III.1 La famille des facteurs de transcription HSF	31
III.1.1 HSF1.....	32
III.1.2 HSF2.....	33
III.1.3 HSF3.....	33
III.1.4 HSF4.....	33
III.2 La structure de la protéine HSF1.....	34
III.3 La régulation de l'activité d'HSF1	35
III.4 Les protéines de choc thermique.....	37
III.4.1 HSP90.....	37
III.4.2 HSP70.....	37
III.4.3 HSP27.....	38
III.5 HSF1, HSP90, HSP70, HSP27 et l'hématopoïèse	39
III.5.1 HSF1.....	39
III.5.2 HSP90.....	40
III.5.3 HSP70.....	40
III.5.4 HSP27.....	41
III.6 La réponse au stress thermique chez le poisson zèbre.....	42
III.6.1 HSF.....	42

III.6.2 HSP.....	44
PROJET DE RECHERCHE.....	46
OBJECTIFS.....	47
MATÉRIELS ET MÉTHODES	49
I. LIGNEES UTILISEES ET ENTRETIEN DES POISSONS ZEBRES	49
II. CRISPR/CAS9	50
II.1. Sélection du site cible du gène HSF1	50
II.2 Conception du sgARN	50
II.3 Conception de la cassette oligonucléotide contenant les codons stops.....	50
II.4 Synthèse des sondes sgADN & sgARN.....	51
II.5 Injection de la protéine Cas9, du sgARN, et de la cassette oligonucléotide contenant les codons stops	52
II.6 Suivi des poissons zèbres injectés par CRISPR/Cas9	52
III. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES.....	54
III.1 Extraction des ARN à partir des embryons et préparation d'ADNc.....	54
III.2 PCR Quantitative	55
IV. CYTOMETRIE EN FLUX.....	55
IV.1 Sur cellules d'embryons.....	55
IV.2 Sur les cellules de poissons adultes (6 mois)	56
IV.2.1 Dissection des poissons	56
IV.2.2 Extraction de cellules à partir d'organes	56
IV.2.3 Cytospin.....	56
V. WESTERN-BLOT	57
V.1 Extraction des protéines	57
V.2 Western-Blot.....	57
VI. ANALYSE DES CELLULES HEMATOPOÏÉTIQUES CHEZ LES EMBRYONS (2JPF).....	58
VI.1 Coloration de l'hémoglobine à l'o-dianisidine	58
VI.2 Coloration des macrophages au rouge neutre	58
VI.3 Morphologie des érythrocytes.....	58
VI.4 Microscopie et imagerie	58
VII. SYNTHÈSE ET INJECTION D'ARN HSF1	59
VII.1 Amplification et purification du plasmide HSF1.....	59
VII.2 Linéarisation et purification du plasmide	59
VII.3 Transcription de l'ARN HSF1	60
VII.4 Injection d'ARN	60
RÉSULTATS	61
I. KNOCK-OUT DE HSF1 VIA LA METHODE CRISPR/CAS9	62
I.1 Obtention de la Génération F0	62
I.2 Obtention de la Génération F1	64
I.3 Obtention de la Génération F2	65
II. EFFET DU KNOCK-OUT DE HSF1 SUR LE DEVELOPPEMENT DU POISSON ZEBRE.....	67
III. VALIDATION DU MODELE KNOCK-OUT DE HSF1	70
IV. EFFET DU KNOCK-OUT DE HSF1 SUR L'ÉRYTHROPOÏÈSE.....	73
IV.1 Effet du knock-out de hsf1 sur l'érythropoïèse primitive	73
IV.1.1 gata1.....	73
IV.1.2 Expression des gènes de globines hbae1 et hbbe1	76
IV.2 Effet du knock-out de hsf1 sur la maturation des érythrocytes	80
V. RESTAURATION DE L'ACTIVITE D'HSF1 DANS LE KNOCK-OUT DE HSF1 PAR INJECTION DE L'ARNM HUMAIN D'HSF1 	81

VI. EFFET DU KNOCK-OUT DE HSF1 SUR L'HEMATOPOÏESE DEFINITIVE.....	83
VII. EFFET DU KNOCK-OUT DE HSF1 SUR LA MYELOPOÏESE.....	87
DISCUSSION.....	89
CONCLUSION.....	95
BIBLIOGRAPHIE.....	97
ANNEXE.....	119

Liste des annexes

- **Annexe 1** : Résultat des sites cibles pour réaliser un knock-out du gène HSF1 via la technique CRISPR/Cas9 après analyse avec l’algorithme CHOPCHOP.
- **Annexe 2** : Article ; Loss of *hsf1* leads to anemia in zebrafish embryos
- **Annexe 3** : Étude des anomalies génétiques des érythrocytoses inexplicées – GenRED (ANR-15-CE17-0021)
- **Annexe 4** : Lettre ; Impact of interferon on a triple positive polycythemia vera.

Liste des figures

FIGURE 1 POISSON ZEBRE FEMELLE (A GAUCHE) ET MALE (A DROITE).....	10
FIGURE 2 STADES PRINCIPAUX DE DEVELOPPEMENT DU POISSON ZEBRE (DE GAUCHE À DROITE : 0, 24, 48, 72, 120HPF) (2).....	11
FIGURE 3 PRINCIPE DU SYSTEME CRISPR/CAS9 (12)	14
FIGURE 4 MISE EN PLACE DE L'HEMATOPOÏESE CHEZ LE POISSON ZEBRE ET LA SOURIS (28,29)	17
FIGURE 5 LOCALISATION ET FONCTION DES SITES HEMATOPOÏÉTIQUES CHEZ LE POISSON ZEBRE AU COURS DE L'HEMATOPOÏESE PRIMITIVE ET DEFINITIVE (28).....	18
FIGURE 6 MORPHOLOGIE DES CELLULES SANGUINES MATURES CHEZ L'HOMME ET LE POISSON ZEBRE (18).....	19
FIGURE 7 MATURATION DE LA LIGNEE ERYTHROÏDE CHEZ LE POISSON ZEBRE (41)	21
FIGURE 8 EXPRESSION RELATIVE PAR RT-QPCR DES GENES A-GLOBINE (A) ET DES GENES B-GLOBINE (B) AU COURS DU DEVELOPPEMENT CHEZ LE POISSON ZEBRE (48).....	22
FIGURE 9 REGULATION DE L'ACTIVITE DE GATA1 ET GATA2 PENDANT L'ERYTHROPOÏESE (59)	24
FIGURE 10 STRUCTURE D'HSF1	34
FIGURE 11 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA REPONSE AU STRESS PAR HSF1 CHEZ LES VERTEBRES (145)	36
FIGURE 12 PRESENTATION SCHEMATIQUE DES DEUX ISOFORMES DE HSF1 CHEZ LE POISSON ZEBRE (144).....	43
FIGURE 13 DIAGRAMME EXPLICATIF POUR L'OBTENTION DU SGARN CONSTITUE DU CRARN ET DU TRACRARN	51
FIGURE 14 STRUCTURE DE L'EXON 9 HSF1	62
FIGURE 15 STRUCTURE EXON 9 HSF1 AVEC LES PRIMERS F1, R1 & R2	63
FIGURE 16 PHOTO DU GEL APRES UNE DOUBLE AMPLIFICATION DE L'ADNG AVEC LES PRIMERS F1R1 & F1R2 CHEZ LES EMBRYONS NON-INJECTES (NI) ET INJECTES (CRISPR HSF1)	63
FIGURE 17 STRUCTURE EXON 9 HSF1 AVEC LES PRIMERS F1, F2, R1, R2 & R3	64
FIGURE 18 PHOTO DE GELS OBTENUS CHEZ UN POISSON ZEBRE F1(CRISPR HSF1 F1) APRES AMPLIFICATION DE L'ADNG AVEC LES COUPLES DE PRIMERS F1R1, F2R3 & F2R2 PAR RAPPORT A UN POISSON WT	65
FIGURE 19 PHOTO DE GEL OBTENU APRES AMPLIFICATION DE F1R1 PAR PCR CHEZ 8 POISSONS ZEBRES (N°33 A 40) ISSUS DU CROISEMENT DE F1 × F1.	66
FIGURE 20 RESULTAT DU SEQUENÇAGE D'UNE PARTIE DE L'EXON9 DE HSF1 APRES INSERTION D'UNE CASSETTE PAR CRISPR/CAS9	66
FIGURE 21 LES EMBRYONS KO HSF1 SURVIVENT MOINS BIEN QUE LES EMBRYONS WT DE 0 A 6JPF MAIS PRESENTENT UN CHORION A 0HPF PLUS IMPORTANT.....	67
FIGURE 22 PRESENCE D'UNE MICROPHALMIE CHEZ LES EMBRYONS KO HSF1 PAR RAPPORT AUX EMBRYONS WT A 48HPF	68
FIGURE 23 ABSENCE DE DIFFERENCE DANS LA LONGUEUR DU CORPS ENTRE LES EMBRYONS WT ET HSF1 ^{-/-} A 48HPF.....	69
FIGURE 24 RESULTAT DE RT-QPCR DU GENE HSP70 A 48HPF (J2) ET 96HPF (J4) DES POISSONS ZEBRES KNOCK-OUT POUR LE GENE HSF1 PAR RAPPORT AUX EMBRYONS WT	70
FIGURE 25 RESULTAT DE RT-QPCR DU GENE HSP70 A 48HPF (J2) ET 96HPF (J4) DES POISSONS ZEBRES KO HSF1 PAR RAPPORT AUX EMBRYONS KO HSF1 AYANT SUBI UN CHOC THERMIQUE	71
FIGURE 26 ÉVALUATION DE L'IMPACT DU KO HSF1 SUR L'EXPRESSION DE LA PROTEINE Hsp70.....	71
FIGURE 27 RESULTAT DE RT-QPCR DU GENE GATA1 A 48HPF ET 96HPF DES POISSONS ZEBRES KNOCK-OUT POUR LE GENE HSF1 PAR RAPPORT AUX EMBRYONS TEMOINS.....	73
FIGURE 28 IMAGE DES CELLULES GATA1:DsRED AU NIVEAU DU CORPS ET DE LA QUEUE CHEZ LES POISSONS ZEBRES Tg(GATA1:DsRed) ET Tg(HSF1 ^{-/-} /GATA1:DsRed) A 48HPF ET 96HPF	74
FIGURE 29 ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DU NOMBRE CELLULES GATA1:DsRED A 48HPF CHEZ LES EMBRYONS Tg(HSF1 ^{-/-} /GATA1:DsRed) PAR RAPPORT AUX EMBRYONS Tg(GATA1:DsRed)	75
FIGURE 30 RESULTAT DE RT-QPCR DU GENE HBAE1 (A) ET HBBE1 (B) A 48HPF ET 96HPF DES POISSONS ZEBRES KNOCK-OUT POUR LE GENE HSF1	76
FIGURE 31 COLORATION DE L'HEMOGLOBINE A L'O-DIANISIDINE A 48HPF CHEZ DES POISSONS ZEBRES TEMOINS ET KO HSF1	77
FIGURE 32 COLORATION DE L'HEMOGLOBINE A L'O-DIANISIDINE A 96 HPF CHEZ DES POISSONS ZEBRES TEMOINS ET KO HSF1	77

FIGURE 33 IMAGE DES CELLULES GLOBINE:GFP AU NIVEAU DE LA QUEUE ET DE LA TETE/CŒUR CHEZ LES POISSONS ZEBRES Tg(GLOBINE:GFP) ET Tg(HSF1 ^{-/-} /GLOBINE:GFP) A 48HPF.....	78
FIGURE 34 ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DU NOMBRE DE CELLULES GLOBINE:GFP A 48HPF CHEZ LES EMBRYONS Tg(HSF1 ^{-/-} /GLOBINE:GFP) PAR RAPPORT AUX EMBRYONS Tg(GLOBINE:GFP).....	79
FIGURE 35 COMPARAISON DE LA MORPHOLOGIE DES ERYTHROCYTES A 48HPF ENTRE LES POISSONS ZEBRES TEMOINS (WT) ET KO HSF1 (HSF1 ^{-/-}) PAR COLORATION MAY-GRUNWALD GIEMSA (GROSSISSEMENT 100X)	80
FIGURE 36 CONFIRMATION DE LA TRADUCTION DE L'ARNM D'HSF1 HUMAIN EN PROTEINE DANS LES POISSONS ZEBRES KO HSF1.....	81
FIGURE 37 RESULTAT DE RT-QPCR DU GENE GATA1 (A), HBAE1 (B) ET HBBE1 (C) A 48 HPF APRES RESCUE PAR INJECTION D'ARNM D'HSF1 HUMAIN DANS LES POISSONS ZEBRES HSF1 ^{-/-}	82
FIGURE 38 LA TAILLE DES ERYTHROCYTES DES POISSONS ZEBRES HSF1 ^{-/-} ADULTES EST AUGMENTEE PAR RAPPORT A CELLE DES ERYTHROCYTES DES POISSONS ZEBRES WT ADULTES.....	83
FIGURE 39 SEPARATION DES PRINCIPALES LIGNEES DE CELLULES SANGUINES DE LA MOELLE RENALE ET DE LA RATE CHEZ LES POISSONS ZEBRES ADULTES WT ET HSF1 ^{-/-}	86
FIGURE 40 RESULTAT DE RT-QPCR DU GENE SPI1 (A), MPO (B) ET LCP1 (C) A 48HPF DES POISSONS ZEBRES KNOCK-OUT POUR LE GENE HSF1.....	87
FIGURE 41 OBSERVATION A 48HPF DES MACROPHAGES CHEZ LES EMBRYONS WT ET KO HSF1 APRES COLORATION.	88

Liste des tableaux

TABLEAU 1 COMPARAISON DE LA SEQUENCE DE HSF-1 DU POISSON ZEBRE AVEC CELLES DE L'HOMME ET DE LA SOURIS EN POURCENTAGE D'IDENTITE DES ACIDES AMINES (220).....	42
TABLEAU 2 POURCENTAGE DES PRINCIPALES POPULATIONS HEMATOPOÏÏTIQUES ISOLABLES DANS LES ORGANES HEMATOPOÏÏTIQUES ADULTES DE LA RATE ET DE LA MOELLE EPINIÈRE CHEZ LES POISSONS ZEBRES HSF1 ^{-/-}	85

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique	HPF	Heure post-fécondation
ADNc	ADN complémentaire	HRA	Domaine de trimérisation A
ADNg	ADN génomique	HRB	Domaine de trimérisation B
AGM	Aorta Gonado Mesonephros	HRC	Domaine de trimérisation C
ARN	Acide Ribonucléique	HRE	Hypoxia Response Element
ARNm	Acide Ribonucléique messenger	HSE	Heat Shock Elements
ATP	Adénosine TriPhosphate	HSF	Heat Shock Factor
BET	Bromure d'Éthidium	HSP	Heat Shock Proteins
BFU-E	Burst Forming Unit – Erythroid	ISP	Ilot Sanguin Postérieur
CAS9	CRISPR associated protein 9	JAK2	Janus Kinase 2
CFU-E	Colony Forming Unit – Erythroid	JPF	Jour post-fécondation
CFU-GEMM	Colony Forming Unit – Granulocytaire, Erythroblastique, Monocytaire et Mégacaryocytaire	KO	Knock-out
crARN	ARN CRISPR	LB	Lysogeny Broth
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique	MCI	Masse Cellulaire Intermédiaire
DBD	Domaine de liaison à l'ADN	MGG	May-Grunwald Giemsa
ENU	Ethylnitrosourée	MLA	Mésoderme Latéral Antérieur
EPO	Érythropoïétine	MLP	Mésoderme Latéral Postérieur
EPO-R	Récepteur de l'Érythropoïétine	MO	Morpholino
EtOH	Ethanol	MPX	Myéloperoxydase
FSC	Forward Scatter	NGS	Next-Generation Sequencing
GM-CSF	Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor	NHEJ	Non Homologous End Joining
GR	Globule rouge	NLS	Nuclease
Hb	Hémoglobine	PAM	Protospacer Adjacent Motif
HDR	Homology Directed Repair	PBS	Phosphate Buffered Saline
HIF	Hypoxia Inducible Factors	PCR	Polymerase Chain Reaction
		PEM	Progéniteur Érythromyéloïde
		PFA	Paraformaldéhyde
		PV	Polycythemia Vera

RD domaine de régulation

SCL Stem Cell Leukemia

sgARN ARN simple guide

sHSP small Heat Shock Proteins

SMD Syndrome Myélodysplasique

SSC Side Scatter

STAT Signal Transducer and Activator of Transcription

TAD domaine de transactivation

THC Tissu Hématopoïétique Caudal

TRIM domaine de trimérisation

ÉTAT DE L'ART

I. Le poisson zèbre : un organisme modèle

I.1 Généralités

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est un poisson téléostéen de l'ordre des Cypriniformes, de la famille des Cyprinidés appartenant au genre *Danio*. C'est un poisson tropical qui peuple les plans d'eaux stagnantes, les rivières à faible courant, les rizières et dont l'habitat naturel se situe dans les régions du nord-est de l'Inde.

Le poisson zèbre, à l'âge adulte, se caractérise par une taille comprise entre 3 et 5 cm. De par sa petite taille, son élevage est aisé et économique.

C'est un poisson osseux, homocerque et qui ne possède pas de nageoire adipeuse. Son corps est fusiforme et montre des stries longitudinales bleu foncé sur fond argenté qui s'étendent des opercules à la nageoire caudale ; ses flancs sont jaune ocre. La nageoire dorsale est bleue, l'anale rayée, les pectorales et ventrales sont transparentes.

A l'âge adulte, il est facile de distinguer le mâle de la femelle car cette espèce présente un léger dimorphisme sexuel. La femelle possède un abdomen plus bombé que le mâle et est dotée d'une papille urogénitale présente à l'arrière des nageoires pelviennes (**Figure 1**).

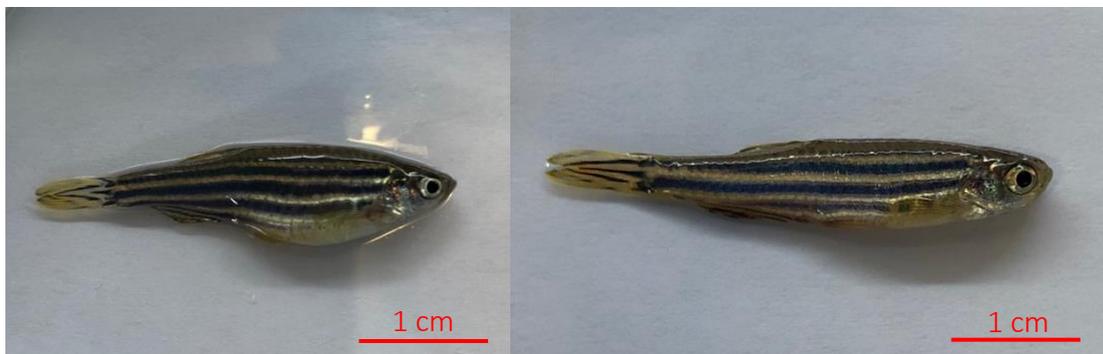


Figure 1 Poisson zèbre femelle (à gauche) et mâle (à droite)

En conditions de laboratoire, les organismes sont maintenus à des températures de l'ordre de 24 à 26°C. Bien que le moment des stades de développement soit normalisé pour une croissance à 28,5°C, les embryons peuvent être élevés à des températures supérieures ou inférieures pour augmenter ou diminuer respectivement la vitesse de développement (1).

Cette espèce se caractérise par un cycle de vie court car son développement est très rapide : l'embryogénèse dure 24 heures et l'organogénèse est entièrement achevée après 5 jours de

développement. La maturité sexuelle est atteinte entre 2 et 3 mois. Une fois cette maturité acquise, une femelle peut pondre jusqu'à 100-200 œufs par semaine.

Contrairement aux mammifères, le développement des embryons *ex-vivo* associé à la transparence des œufs et des larves du poisson zèbre favorise l'observation ou la manipulation des embryons au stade unicellulaire.

La visualisation de la formation et de la fonction des organes internes chez le poisson zèbre permet la mise en évidence d'éventuels défauts phénotypiques.

I.2 Les principales étapes du développement du poisson zèbre

Le développement embryon-larvaire du poisson zèbre est divisé en huit périodes fondamentales constituées chacune de plusieurs stades (1) et se caractérise par sa rapidité (**Figure 2**).

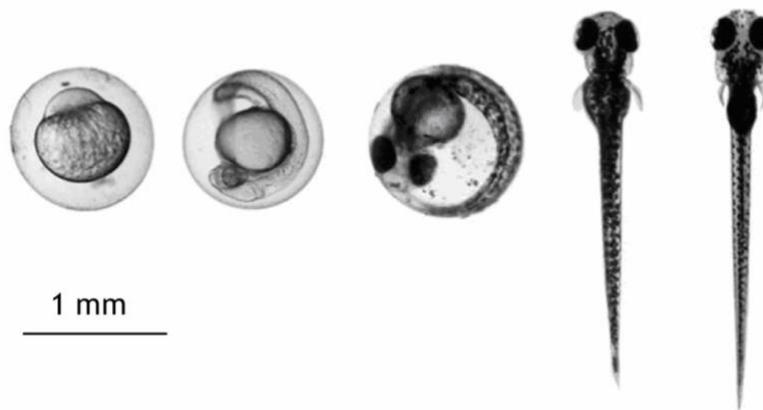


Figure 2 Stades principaux de développement du poisson zèbre (de gauche à droite : 0, 24, 48, 72, 120hpf) (2)

A $t = 0$ heure post-fécondation (hpf), la période zygotique commence dès que l'œuf est fertilisé. L'œuf est constitué d'une cellule unique et d'une zone de réserve, le vitellus. Il est protégé par une membrane, appelée le chorion. Après 4 périodes de division intense (division – blastula – gastrula – segmentation), les rudiments des organes primaires deviennent visibles et les premières cellules se différencient morphologiquement. Les somites se développent et le bourgeon caudal devient plus important. Les premiers mouvements de l'embryon au sein du chorion apparaissent.

A $t = 24$ hpf, la période pharyngienne est marquée par le début de la pigmentation de la peau et de la rétine. Le système circulatoire se développe : on observe les premiers battements cardiaques avec des cellules sanguines en mouvement. La notochorde est bien développée et

le cerveau est constitué de 5 lobes distincts. Des contractions musculaires brusques sont très fréquentes.

A t = 48 hpf, la période d'éclosion est marquée par l'achèvement de la morphogénèse des organes primaires et le poisson zèbre continue sa croissance : développement des nageoires pectorales et de la tête. Les mouvements spontanés disparaissent et la pigmentation devient très importante.

A t = 72 hpf, la période larvaire précoce commence par l'éclosion et l'embryon devient une larve en pleine croissance. Elle est active via la mobilité de ses nageoires pectorales associée à des mouvements de ses mâchoires et de ses yeux. Le premier os, le cleithrum, apparaît au cours de cette période.

A t = 120 hpf, l'ensemble de ces développements permet à la larve de se nourrir, de respirer et de répondre rapidement à des stimuli par la fuite.

I.3 Le poisson zèbre : un modèle génétique

I.3.1 Le génome du poisson zèbre

L'utilisation du poisson zèbre comme modèle animal a augmenté de façon exponentielle à partir des années 1990, lorsque les premières analyses de son génome ont montré le potentiel de ce modèle animal pour identifier et caractériser de nouveaux gènes impliqués dans le développement et la maladie des vertébrés.

Le génome du poisson zèbre a été entièrement séquencé par Howe et son équipe en 2013 (3). Il possède environ 26000 gènes codant des protéines, dispersés sur 25 chromosomes. Le génome du poisson zèbre présente 70% de gènes orthologues avec le génome humain et 82% des gènes (2601/3176 gènes) qui ont des descriptions de morbidité (version « malade », mutée du gène en cause) répertoriées dans la base de données OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) possèdent, au moins un gène orthologue de poisson-zèbre.

L'étude du génome du poisson zèbre a montré la présence d'une duplication de certains gènes avec la présence de deux copies, co-orthologues d'un gène humain unique (4,5). Ces gènes supplémentaires peuvent être dus à la duplication du génome chez l'ancêtre des Téléostéens mais aussi à des polyploïdisations (duplication du matériel génétique) plus récentes.

Il est important de prendre en compte la présence éventuelle d'une copie supplémentaire du gène étudié dans le génome du poisson zèbre lorsqu'une recherche d'un gène orthologue à un gène de mammifère est effectuée chez le poisson zèbre.

I.3.2 Invalidation de gènes par le système CRISPR/Cas9

Les fonctions des gènes CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) et CRISPR-Cas sont essentielles à l'immunité adaptative de certaines bactéries et archées, permettant aux organismes de répondre au matériel génétique étranger et d'éliminer celui-ci. Ces répétitions ont été initialement découvertes dans les années 1980 chez *Escherichia coli* (6), mais leur fonction n'a été confirmée qu'en 2007 par Barrangou et son équipe, qui ont démontré que *S. thermophilus* peut acquérir une résistance contre un bactériophage en intégrant un fragment du génome d'un virus infectieux dans son locus CRISPR (7).

L'ADN invasif provenant de virus ou de plasmides est coupé en petits fragments par digestion par la bactérie. Ces fragments sont par la suite incorporés spécifiquement sous forme de séquences de 20 paires de bases, appelées spacers, dans le génome de la bactérie parmi une série de courtes répétitions, les CRISPR (8).

Les loci CRISPR et les spacers sont transcrits et les produits de transcriptions vont ensuite générer, après digestion, de petits ARN (crARN – ARN CRISPR) qui sont utilisés pour guider les endonucléases effectrices. Ces endonucléases ciblent l'ADN étranger en fonction de la complémentarité des séquences (9).

Trois types de mécanismes CRISPR ont été identifiés, dont le type II est le plus étudié sur le plan thérapeutique car le plus facile à mettre en place. Le mécanisme CRISPR de type II est unique par rapport aux autres systèmes CRISPR qui font intervenir de nombreuses protéines Cas, car une seule protéine, la protéine Cas9, est nécessaire pour l'extinction des gènes (10).

Chaque ARN guide ou simple guide ARN (sgARN) est constitué après hybridation d'un crARN et d'un tracrARN. Le crARN est spécifique et complémentaire de la séquence cible d'ADN à cliver (**Figure 3**). Le tracrARN ou transactivating ARN a comme rôle majeur de lier le sgARN formé à la protéine Cas9.

Au contact de l'ADN double brin, la Cas9 reconnaît la présence d'une courte séquence conservée de 2 à 4 paires de base, connue sous le nom de motif associé au proto-espaceur (protospacer adjacent motif ou PAM), situé en aval de la séquence cible de 20 paires de bases de l'ADN (11). Après fixation de la Cas9 au PAM, une recherche de complémentarité est réalisée par la cas9 entre l'ARN guide et la séquence d'ADN située en amont du PAM.

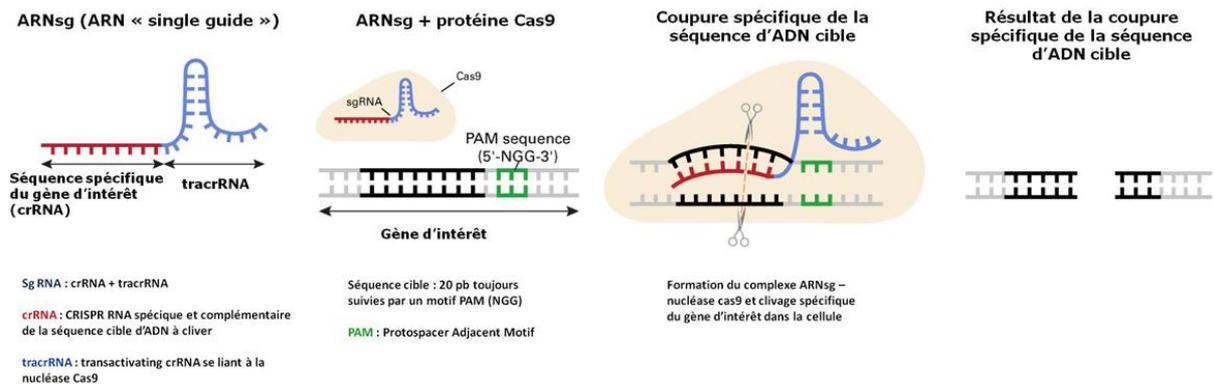


Figure 3 Principe du système CRISPR/Cas9 (12)

Si le sgARN est complémentaire avec les 12 premières bases de l'ADN, la fixation du crARN a lieu par simple liaison Watson-Crick et dans le même temps, l'ADN se déroule pour former une boucle R, boucle composée d'ADN simple brin formé par hybridation avec un ARN.

Cette fixation entraîne une modification conformationnelle de la protéine Cas9 qui déclenche l'activité nucléase de ses deux domaines catalytiques : un domaine HNH situé dans la région centrale de la protéine et qui coupe au niveau du brin complémentaire au sgARN et un domaine RuvC qui réside à l'extrémité amino et qui coupe le brin opposé. Ces deux domaines vont cliver et couper de façon précise chaque brin d'ADN générant des cassures doubles brins (9).

Suite à la coupure spécifique de la séquence d'ADN cible, deux mécanismes principaux peuvent réparer ces cassures, soit spontanément par jonction des extrémités non homologues (*non homologous end joining* ou NHEJ), aboutissant au Knock-Out (KO) du gène cible, soit par une recombinaison homologue (*homology directed repair* ou HDR) en recopiant une séquence homologue, insérée via un vecteur donneur. Cette séquence insérée permet de réaliser des Knock-Out/In, réparation ou délétion de gène.

En biotechnologie, le terme CRISPR/Cas9 désigne donc une technique d'édition génomique constituée de l'enzyme Cas9 et de son guide d'ARN artificiel dans lequel est insérée la séquence de 20 paires de bases à cibler à la place du spacer dans le crARN. La technologie CRISPR/Cas9 est la méthode qui permet de modifier cellules, tissus et organismes entiers de manière universelle : chez les plantes, animaux ou bactéries.

Les modifications génétiques chez le poisson zèbre *via* le système CRISPR/Cas9 sont très efficaces et spécifiques pour générer des KO ou des knock-in (13). Il a été montré que l'efficacité de mutagenèse *via* CRISPR/Cas9 chez le poisson zèbre peut atteindre 86% (14) avec des effets hors cible négligeables.

II. Hématopoïèse

Chez les vertébrés, l'hématopoïèse est un processus qui se déroule au niveau de différents organes en deux vagues distinctes (15) : l'hématopoïèse primitive et l'hématopoïèse définitive. Au cours de ce processus, tous les types de cellules sanguines vont être produits à partir d'une cellule souche commune qui est à la fois pluripotente et auto-renouvelable.

Ces cellules souches hématopoïétiques (CSH) se différencient d'abord en progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes communs. Les progéniteurs myéloïdes communs se différencient en progéniteurs mégacaryocytes/érythroïdes et en progéniteurs granulocytes/monocytes. Les progéniteurs de mégacaryocytes/érythroïdes vont donner naissance à des érythrocytes (globules rouges) ou des mégacaryocytes (précurseurs des plaquettes), tandis que les progéniteurs de granulocytes/monocytes vont donner naissance à des granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), à des monocytes (macrophages) et à des cellules dendritiques. Dans le même temps, les progéniteurs lymphoïdes communs se différencient en lymphocytes B, lymphocytes T et lymphocytes natural killer NK.

II.1 Hématopoïèse chez le poisson-zèbre versus mammifères

II.1.1 Hématopoïèse primitive (embryonnaire)

Chez les mammifères, les premières cellules souches hématopoïétiques apparaissent à partir des îlots sanguins situés dans le sac vitellin extra-embryonnaire. Elles donnent naissance aux érythrocytes précoces et aux cellules myéloïdes primitives nécessaires au développement des tissus embryonnaires (16) (**Figure 4**).

Chez le poisson zèbre, le processus d'hématopoïèse embryonnaire, aussi appelé « phase primitive », se situe à deux endroits du mésoderme embryonnaire (17) : le mésoderme latéral antérieur (MLA) et le mésoderme latéral postérieur (MLP) qui formera plus tard la masse cellulaire intermédiaire (MCI). Le MLA est le lieu de la myélopoïèse primitive alors que le MCI est le lieu majeur de l'érythropoïèse primitive (18).

A partir de 10 hpf, l'expression du gène *scl* (*Stem Cell Leukemia*) au niveau du MLP, puis du MLA, (19) marque la formation de cellules souches hématopoïétiques primitives ainsi que de précurseurs vasculaires, appelés angioblastes.

Par la suite, à la fois dans le MLA et dans le MLP, les cellules co-expriment des facteurs de transcription hématopoïétiques *gata2* et *lmo2*, et des facteurs de transcription vasculaires *fli1* et *flk1* (19,20).

Dans le MLP (**Figure 5**), à partir de 18hpf, les cellules migrent pour former un nouveau site hématopoïétique exprimant *gata1*, le MCI. Le facteur de transcription *gata1* est un régulateur essentiel de l'érythropoïèse primitive et le nombre de précurseurs érythroïdes *gata1+* augmente au fur et à mesure de la formation du MCI. Au niveau du MCI, les cellules issues du MLP se différencient en proérythroblastes et en cellules endothéliales pour former le système vasculaire. Autour de 24 hpf, environ 300 à 500 proérythroblastes *gata1+* (21) quittent la MCI et entrent dans la circulation qui a débuté suite au battement du cœur. Une fois dans la circulation, les progéniteurs érythroïdes primitifs se développent en érythrocytes matures et expriment des gènes érythroïdes spécifiques nécessaires à la synthèse de l'hémoglobine (Hb), tels que la *globine*, *l'alas2*, *fch* et *urod* (22,23). Ces cellules érythroïdes primitives seront présentes dans la circulation jusqu'à 4 jours post-fécondation (jpf) (24).

Dans le MLA, second site de l'hématopoïèse primitive, les progéniteurs primitifs deviennent des progéniteurs myéloïdes (*pu.1+*) ou des cellules endothéliales (*flk1/vegfr2+*) à partir de 12 hpf (25,26) et aucune expression de *gata1* n'y est détectée puisqu'il n'y a pas de production de proérythroblastes. Le facteur de transcription *pu.1* est le régulateur principal du développement des cellules myéloïdes.

A partir de 16 hpf, les précurseurs myéloïdes *pu.1+/scl+* donnent naissance à des granulocytes et des macrophages (26). Comme chez l'homme, les macrophages/monocytes chez le poisson-zèbre expriment seulement la *l-plastine* (*leucocyte-specific plastin*) alors que les granulocytes expriment également la myéloperoxydase (*mpx*) (25). Les monocytes et macrophages seront donc *mpx-/l-plastin+* alors que les granulocytes seront *mpx+/l-plastin+*.

Il existe une interaction entre les facteurs de transcription *gata1* et *pu.1* au cours de l'hématopoïèse primitive pour réguler finement la production des cellules érythroïdes et myéloïdes.

Le site précurseur de l'hématopoïèse définitive est l'îlot sanguin postérieur (ISP) où se trouvent dès 24 hpf les progéniteurs érythromyéloïdes (PEM) (27). Ces PEM présentent une morphologie blastique immature et n'expriment que des gènes érythroïdes et myéloïdes. Ces progéniteurs transitoires, nés indépendamment des CSH et sans capacité d'auto-renouvellement, permettraient d'initier une hématopoïèse définitive dans l'embryon en développement du poisson zèbre.

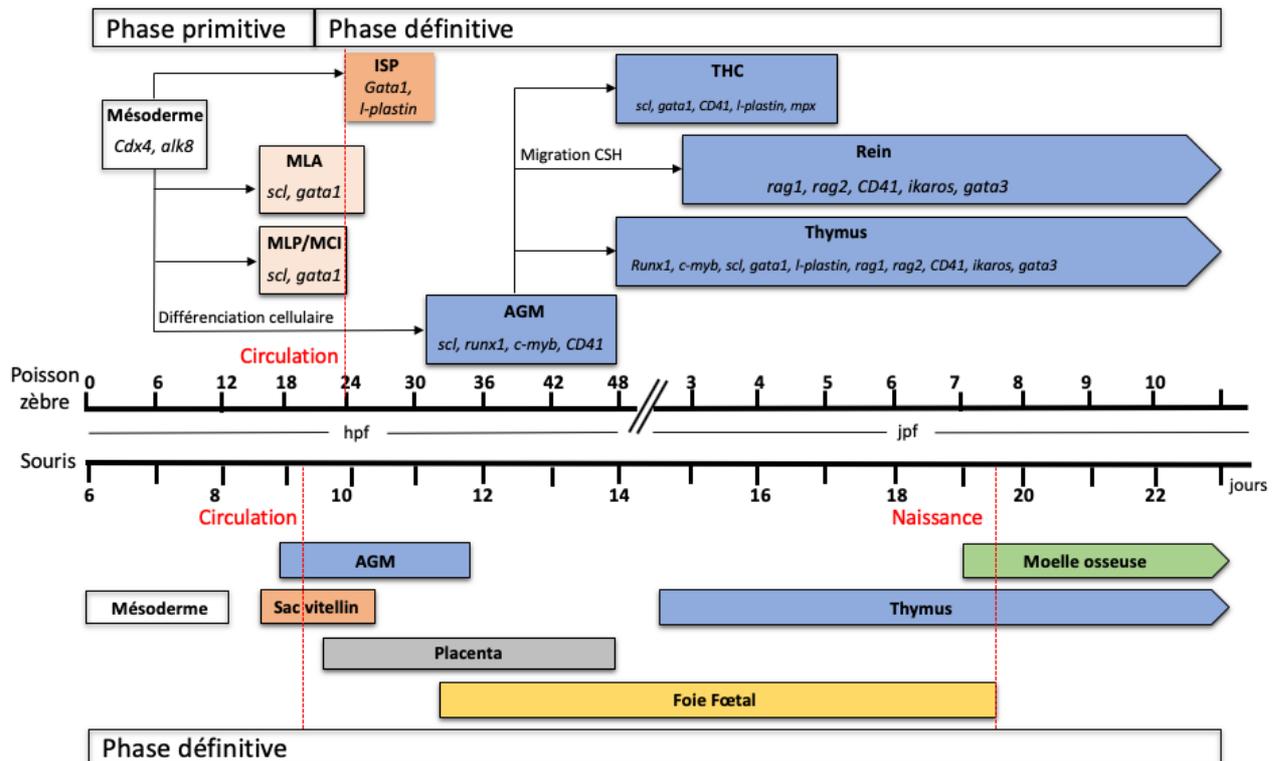


Figure 4 Mise en place de l'hématopoïèse chez le poisson zèbre et la souris (28,29)

Légende : hpf : heure après fécondation, jpf : jour post-fécondation, MLA : Mésoderme Latéral Antérieur, ISP : îlot sanguin postérieur, MLP : Mésoderme Latérale Postérieure, MCI : Masse Cellulaire Intermédiaire, AGM : Aorta Gonado Mesonephros, THC : Tissu Hématopoïétique Caudal,

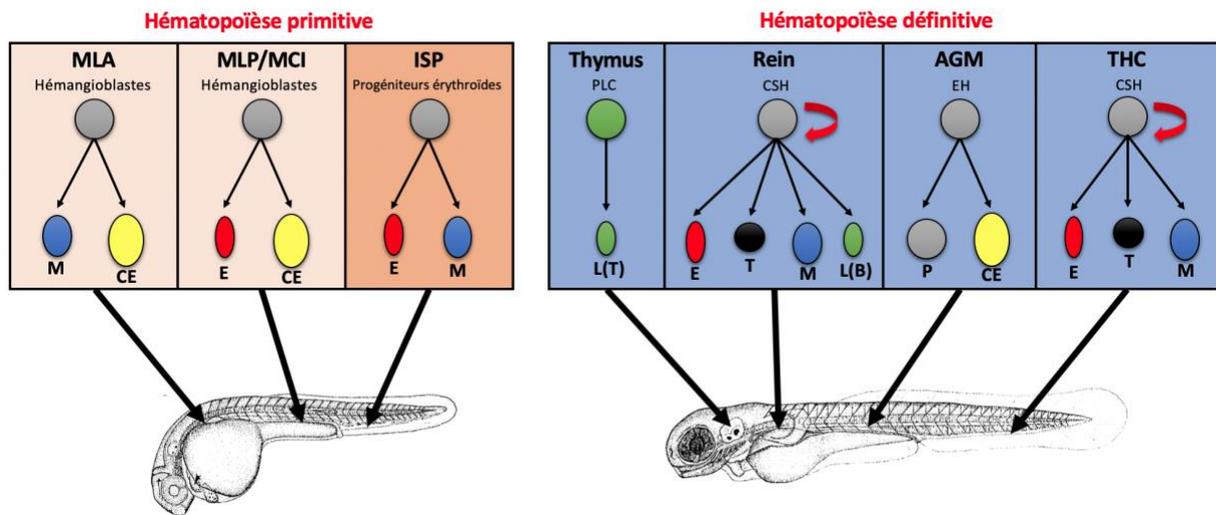


Figure 5 Localisation et fonction des sites hématopoïétiques chez le poisson zèbre au cours de l'hématopoïèse primitive et définitive (28)

Légende : PLC : Progéniteur Lymphoïde commun, EH : Endothélium Hémogénique, CSH : Cellule Souche Hématopoïétique, THC : Tissu Hématopoïétique Caudal, M : Macrophages (bleu), CE : Cellules Endothéliales (jaune), E : Érythrocytes (rouge), LT : Lymphocytes T (vert), T : Thrombocytes (noir), LB : Lymphocytes B (vert), P : Progéniteurs (gris).

II.1.2 Hématopoïèse définitive (adulte)

La deuxième vague d'hématopoïèse, également connue sous le nom de vague définitive, commence dans l'embryon de poisson zèbre à partir de 30 hpf. Contrairement aux CSH primitives, les CSH définitives sont multipotentes et capables de s'auto-renouveler de manière illimitée en générant toutes les lignées hématopoïétiques matures.

Chez les mammifères, ces CSH sont étroitement associées à la paroi ventrale de l'aorte dorsale dans une région connue sous le nom d'aorta-gonado-mésonephros (AGM), avant de passer ensuite au niveau du foie fœtal et à la moelle osseuse, organe hématopoïétique adulte (15).

L'équivalent de l'AGM chez le poisson zèbre se retrouve également dans la paroi ventrale de l'aorte dorsale, où plusieurs marqueurs de CSH sont exprimés entre 24 et 48hpf. Pendant que l'expression de *gata1*, *gata2* et *scl* diminue dans le MCI, l'expression du facteur de transcription *runx1* est retrouvée au niveau des CSH (30) mais également dans les cellules endothéliales de l'AGM peu après 24 hpf (31). Vers 36 hpf, l'expression du facteur de transcription *c-myb* est détectée dans les cellules *runx1+*.

Par la suite, ces CSH définitives migrent vers la région postérieure de la queue du poisson zèbre, appelée tissu hématopoïétique caudal (THC) (32). Le THC est un site d'érythropoïèse et également de myélopoïèse (33). À partir de 2 jpf, ces CSH migrent vers le thymus (3 jpf), où commence la lymphopoïèse, et le rein (4 jpf) (32). À partir de 6 jpf, le rein devient le site définitif

de l'hématopoïèse, équivalent de la moelle osseuse chez les mammifères, où des CSH sont retrouvées entre les tubules rénaux.

Les cellules sanguines (**Figure 6**) définitives sont composées d'érythrocytes, de granulocytes, de monocytes, de lymphocytes et de thrombocytes (34). Les érythrocytes adultes de poissons zèbres sont nucléés tandis que les érythrocytes de mammifères adultes ne conservent pas leur noyau. Les thrombocytes de poisson zèbre sont des cellules sanguines nucléées équivalentes aux plaquettes de mammifère, qui fonctionnent pour maintenir l'hémostase en facilitant la formation de caillots (35). Les noyaux des neutrophiles du poisson zèbre sont légèrement différents de leurs homologues humains car ils ne possèdent que deux ou trois segments par rapport aux quatre ou cinq segments retrouvés chez le neutrophile humain (18). Les éosinophiles du poisson zèbre ont un cytoplasme très granulaire, mais ne possèdent pas le noyau bilobé observé chez les éosinophiles humains (18).

Comme les mammifères et les autres vertébrés, le poisson-zèbre possède un système immunitaire adaptatif complet avec des cellules B exprimant des immunoglobulines et des cellules T exprimant des récepteurs de cellules T spécifiques de l'antigène (36). La maturation des cellules T a lieu dans le thymus du poisson zèbre, comme chez la souris et l'homme.

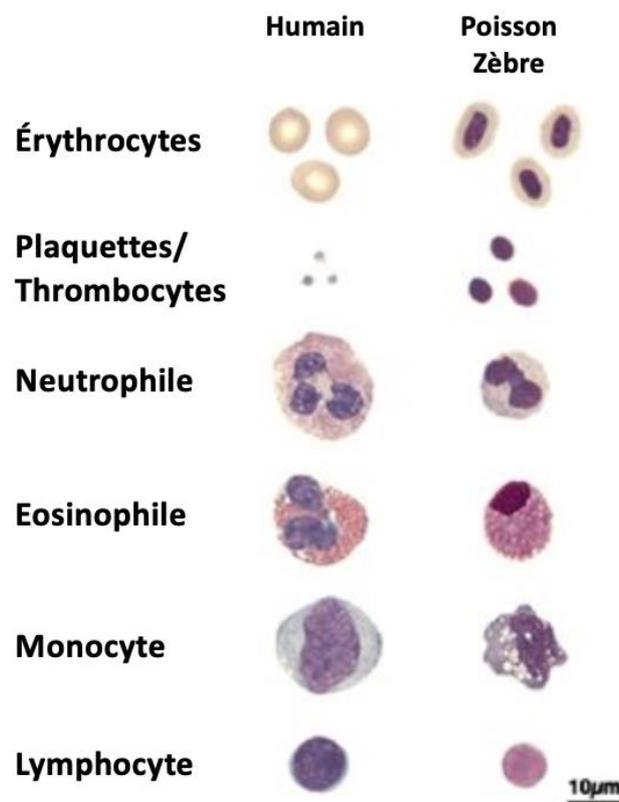


Figure 6 Morphologie des cellules sanguines matures chez l'homme et le poisson zèbre (18)

II.2 Érythropoïèse

L'érythropoïèse est le processus produisant les érythrocytes ou globules rouges (GR) qui sont les cellules les plus représentatives en termes de nombre de cellules. Ce processus est similaire chez les mammifères et le poisson zèbre avec l'implication des mêmes gènes importants mais il présente quelques différences.

II.2.1 Érythrocytes

Chez les mammifères, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) donnent naissance, au niveau de la moelle osseuse, à un progéniteur multipotent, appelé CFU-GEMM (Colony Forming Unit – Granulocytaire, Erythroblastique, Monocytaire et Mégacaryocytaire). Ces CFU-GEMM peuvent se différencier en quatre lignées de progéniteurs plus matures comprenant les progéniteurs érythroblastiques (37,38).

Ces progéniteurs érythroblastiques se différencient en progéniteurs immatures ou BFU-E (Burst Forming Unit – Erythroid) à division lente et ayant l'aspect de colonies éclatées. Le BFU-E est dépendant du SCF (Stem Cell Factor) et de d'autres facteurs de croissance hématopoïétiques comme IL-3 (Interleukine-3) ou le GM-CSF (Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor). Le BFU-E va se différencier en progéniteurs plus matures ou CFU-E (Colony Forming Unit – Erythroid) à division rapide et qui sont hypersensibles à l'EPO.

Ces progéniteurs sont capables d'expansion (divisions avec renouvellement) et sont morphologiquement identiques mais ils peuvent être identifiés grâce au type de colonies qu'ils génèrent dans des systèmes de culture *in vitro* en milieu semi-solide. Les précurseurs ne sont capables que de divisions avec différenciation mais ils sont identifiables morphologiquement au cours de leur différenciation par des colorations au May-Grunwald-Giemsa (MGG). Il est également possible d'analyser des marqueurs de surface spécifique (CD235a) ou non (CD34) par cytométrie en flux de la lignée érythroïde dont l'expression varie au cours de la différenciation.

Les premiers précurseurs, issus des progéniteurs CFU-E, sont les proérythroblastes qui vont donner naissance après des mitoses successives aux érythroblastes (Érythroblaste basophile – Érythroblaste polychromatophile de type I – Érythroblaste polychromatophile type II – Érythroblaste polychromatophile – Érythroblaste acidophile) puis aux réticulocytes.

La différenciation d'érythroblaste acidophile en réticulocyte entraîne la condensation du noyau jusqu'à son énucléation avant l'entrée dans la circulation sanguine des réticulocytes. Au bout

de deux à trois jours, les réticulocytes donnent naissance aux érythrocytes (39). Cette énucléation se produit dans une niche érythroïde, appelée "île érythroblastique", dans laquelle les érythroblastes prolifèrent et se différencient autour d'un macrophage central (40).

Au cours de ce processus, on distingue trois caractéristiques morphologiques : une réduction progressive de la taille des cellules, une perte progressive de la basophilie des cellules avec hémoglobinisation du cytoplasme et une perte du noyau.

Chez le poisson zèbre, en 2007, Qian et son équipe (41) ont montré que les érythrocytes primitifs normaux de 30 hpf à 5 jpf (**Figure 7**) peuvent être classés en fonction de la taille de la cellule, de la forme du noyau et de la coloration du cytoplasme en quatre stades principaux : stade I, érythroblaste basophile ; stade II, érythroblaste polychromatophile ; stade III, érythroblaste orthochromatophile ; et stade IV, érythrocyte mature.

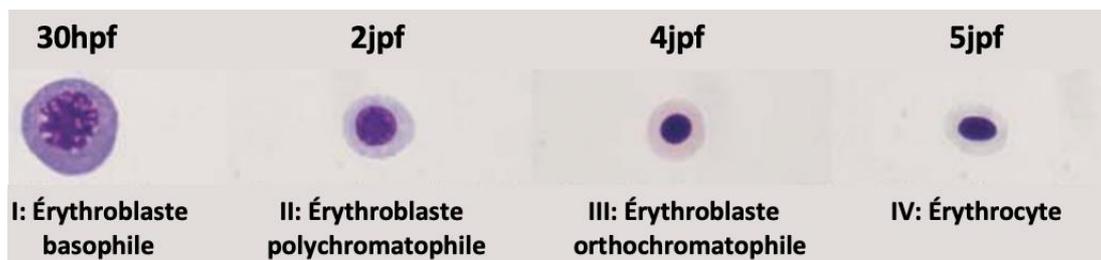


Figure 7 Maturation de la lignée érythroïde chez le poisson zèbre (41)

Les érythrocytes adultes de poissons zèbres sont nucléés et possèdent une forme elliptique aplatie caractéristique de $7 \times 10 \mu\text{m}$ (42) avec un large noyau allongé et peu de cytoplasme tandis que les érythrocytes de mammifères adultes ont une forme discoïde biconcave et ne conservent pas leur noyau (43). En effet, seuls les érythrocytes de mammifères primitifs sont également nucléés (43).

Les érythrocytes contiennent l'hémoglobine, qui transporte l'oxygène des poumons ou branchies aux tissus du corps. Les facteurs de transcription intrinsèques (GATA1) et les molécules de signalisation extrinsèques (EPO) régulent de manière coordonnée la différenciation des érythrocytes et la synthèse de l'hémoglobine.

II.2.2 Hémoglobine

L'hémoglobine est une hétéroprotéine, c'est-à-dire qu'elle est constituée d'une fraction protéique, la globine, et d'une fraction non protéique, l'hème contenant du fer (44).

La globine est une protéine tétramérique constituée de deux sous-unités α -globine et de deux sous-unités β -globine. Chez l'homme, il existe trois gènes d'alpha-globines et cinq gènes de bêta-globines (45). Ces gènes vont être exprimés à différents stades de l'ontogenèse et vont être situés sur des chromosomes séparés et disposés dans l'ordre d'expression au cours du développement. Certains sont spécifiquement exprimés pendant la vie embryonnaire, d'autres pendant le développement fœtal et d'autres encore sont spécifiques de l'âge adulte (46). De plus, ces isoformes vont présenter au cours du développement des affinités différentes pour l'oxygène ; avec une affinité plus élevée pour les formes embryonnaires par rapport aux formes adultes (47).

Comme les autres vertébrés supérieurs, le poisson zèbre possède une hémoglobine avec une structure quaternaire ($\alpha_2\beta_2$). On distingue pendant le développement embryonnaire (**Figure 8**), trois alpha-globines et trois bêta-globines (22) puis trois alpha et deux bêta-globines au cours de l'âge adulte (23).

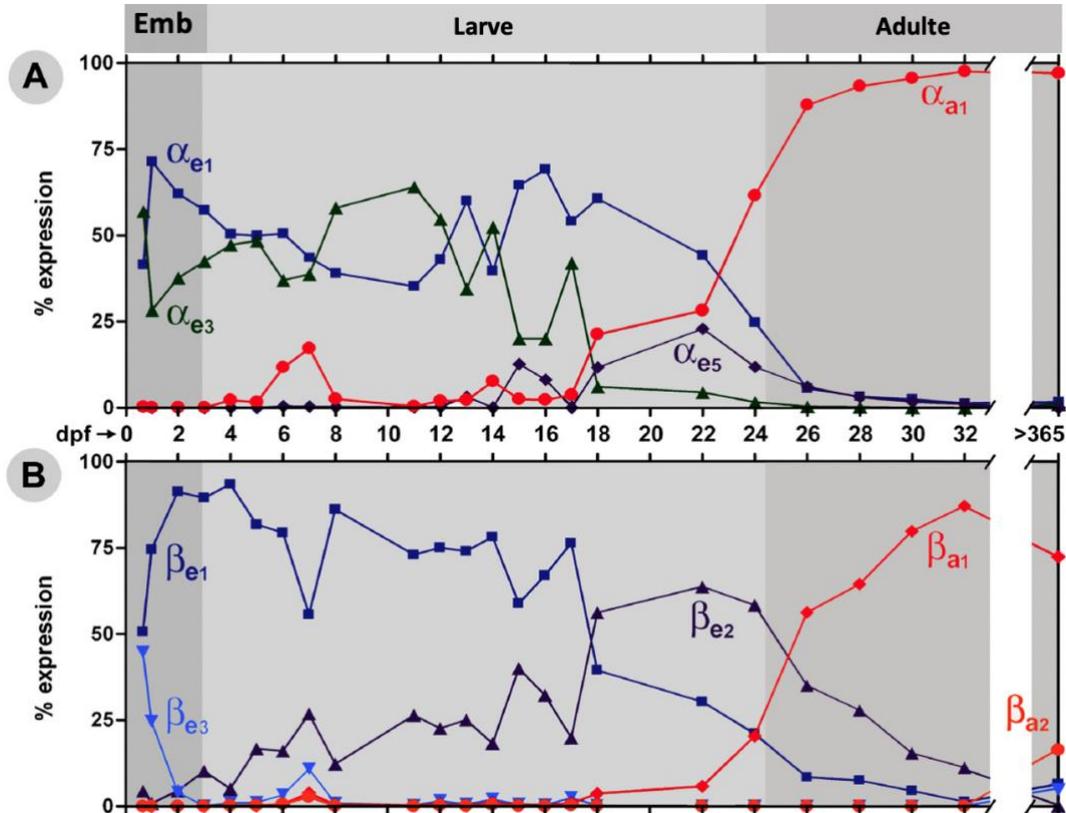


Figure 8 Expression relative par RT-qPCR des gènes α -globine (A) et des gènes β -globine (B) au cours du développement chez le poisson zèbre (48)

Ces gènes sont situés sur le même chromosome et se trouvent séparés par de l'ADN génomique non codant.

Chez les mammifères, le passage de l'expression de la globine embryonnaire à celle de la globine adulte est connu sous le nom de commutation de la globine. En 2012, Ganis et son équipe (48) ont montré que le changement de globine chez le poisson zèbre était similaire aux changements de globine observés chez l'homme et la souris (49,50) avec une conservation au niveau moléculaire et fonctionnel. Ainsi, la permutation des chaînes de globine embryonnaire aux chaînes de globine adulte chez le poisson zèbre a permis de caractériser les changements de globine selon deux processus différents. Tout d'abord, le passage de l'embryon à la larve environ 3 jpf et le passage de la larve à l'adulte environ 24 jpf (48).

II.2.3 Les facteurs régulateurs de l'érythropoïèse

II.2.3.1 GATA 1

Le facteur de transcription GATA-1 appartient à la famille des facteurs de transcription GATA composée de 6 membres : GATA-1 à GATA-6.

Ces facteurs de transcription se caractérisent par un site de liaison à l'ADN commun (5' (A/T) GATA (A/G) 3') (51) et sont subdivisés en deux sous-familles en raison de leur expression : GATA-1, GATA-2 et GATA-3 sont exprimés principalement dans les cellules hématopoïétiques (52), tandis que GATA-4, GATA-5 et GATA-6 sont exprimés dans les poumons, les intestins et le cœur (53).

Sur le plan structural, la protéine GATA-1 possède un domaine N-terminal ayant une fonction de transactivation et deux domaines en doigt de zinc fortement conservés :

- Le doigt de zinc C-terminal : responsable de la reconnaissance de la séquence consensus GATA et donc de la liaison à l'ADN au niveau des gènes cibles (53)
- Le doigt de zinc N-terminal : nécessaire à la spécificité et la stabilité de cette interaction et important pour la formation de complexe avec des cofacteurs tels que la protéine de spécificité 1 (SP1) et le facteur de transcription érythroïde de type Krueppel (EKLF) (54)

Sur le plan fonctionnel, GATA-1 est un facteur de transcription majeur de l'hématopoïèse. Il est fortement exprimé dans les cellules érythroïdes (55), les éosinophiles (56), les mégacaryocytes (57), et les mastocytes (57). Lorsque GATA1 est exprimé, il se lie au promoteur de GATA2, exprimé dans les CSH et dans les progéniteurs érythroïdes, afin d'inhiber sa transcription (**Figure 9**). Ce changement est essentiel pour l'érythropoïèse (58).

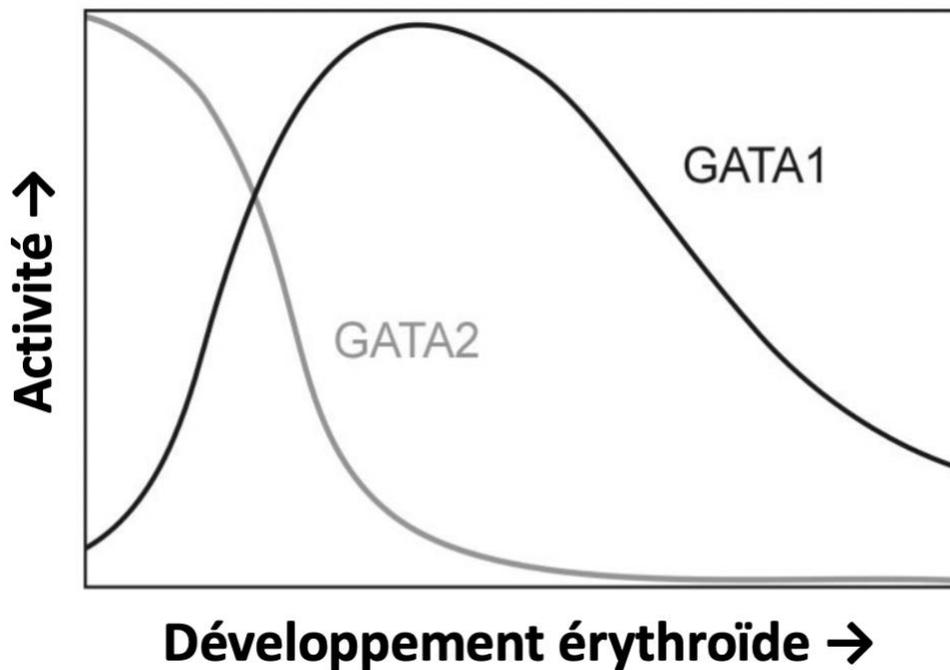


Figure 9 Régulation de l'activité de GATA1 et GATA2 pendant l'érythropoïèse (59)

GATA-1 est un facteur de transcription qui joue un rôle primordial au cours de l'érythropoïèse primitive et définitive. *In vitro*, des cellules souches embryonnaires déficientes pour le gène GATA1 sont incapables de se différencier et de produire des progéniteurs érythroïdes primitifs. Ces cellules montrent un arrêt de développement des progéniteurs érythroïdes définitifs (60) qui meurent au stade proérythroblaste par apoptose (52). *In vivo*, des souris invalidées (KO : Knock-Out) pour le gène *Gata-1* présentent d'importants défauts de l'érythropoïèse par non-différenciation des érythroblastes en érythrocytes mais sans aucun défaut sur la production des autres types de cellules hématopoïétiques et meurent entre 10.5 et 11.5 jours de développement embryonnaire d'une anémie sévère (55,61). D'autres souris mutées également sur le promoteur de *Gata-1* mais avec des niveaux d'expression variable (62,63) meurent au cours du développement embryonnaire ou après la naissance à cause d'une différenciation érythroïde inefficace, mais certaines naissent et survivent jusqu'à l'âge adulte (64). L'analyse de ces différents modèles de souris montre une relation directe entre le niveau d'expression de *Gata-1* et la sévérité du phénotype.

Chez l'homme, un défaut d'expression du gène *GATA-1* peut être à l'origine d'anémie, de trouble myéloprolifératif transitoire, de leucémie mégacaryoblastique aiguë et de porphyrie érythropoïétique congénitale (65).

GATA-1 interagit également avec plusieurs gènes :

- Gènes codant les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'hème, ALAS2 (66) et PBGD (67)
- Gènes codant les protéines de la membrane érythrocytaire comme l' α -spectrine, la protéine 4.9 et Band3 (68,69).
- Liaison au promoteur des gènes de la *Globine α* et *β* (51,70)
- Implication dans la régulation positive de la transcription du gène du *EPO-R* (71)
- Régulation positive de l'expression du gène Bcl-XL en coopération avec l'EPO, (72) permettant un rôle anti-apoptotique majeur de GATA-1 au cours de l'érythropoïèse ce qui empêche l'apoptose des érythroblastes en cours de différenciation.

L'orthologue *gata1* du poisson zèbre a été identifié en 1995 par Detrich et son équipe (73). Les embryons de poissons zèbres ont la capacité de survivre sans hémoglobine ou GR pendant au moins les quinze premiers jours de développement (74) car ils peuvent obtenir de l'oxygène par diffusion (75). Il est donc possible de réaliser des études détaillées dans des modèles de poisson-zèbre sur les stades ultérieurs de l'hématopoïèse et notamment dans l'érythropoïèse définitive, malgré les défauts constatés aux premiers stades, ce qui n'est pas possible *in vivo* dans d'autres organismes.

Le premier mutant chez le poisson zèbre pour le gène *gata1* est porteur de la mutation R339X (*vlad tepes*) (76) qui affecte le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de transactivation. Cette mutation entraîne d'importants défauts dans l'érythropoïèse primitive et définitive mais pas dans les autres lignées hématopoïétiques ce qui est cohérent avec les résultats obtenus chez les souris KO *Gata1*. Ces poissons survivent jusqu'à 14 jpf par diffusion passive d'oxygène. Le deuxième mutant est porteur de la mutation T301K (*bloodless*) (77) qui affecte uniquement le domaine de liaison à l'ADN de *gata1*. L'érythropoïèse primitive est également fortement affectée, mais l'érythropoïèse définitive est normale. La différence d'impact sur la lignée érythroïde entre ces deux mutants pourrait s'expliquer par la nature des mutations.

Le modèle de poisson zèbre a permis *via* le développement de lignée transgénique porteuse de marqueur fluorescent (GFP, DsRed) d'étudier plus précisément la lignée érythroïde. En 1997, Long et son équipe (21) ont créé le premier poisson transgénique, où la GFP était sous le contrôle du promoteur *gata1*, permettant le suivi *in vivo* des cellules érythroïdes pendant leur stade précoce de différenciation.

II.2.3.2 Autres facteurs érythroïdes

Le facteur de transcription GATA1 interagit avec d'autres facteurs de transcription au cours de l'érythropoïèse dont notamment FOG1 (Friend of GATA1), EKLF (Erythroid Kruppel Like Factor) et PU.1 (78).

Le facteur de transcription FOG-1 (79) est le principal cofacteur de GATA-1. La protéine contient 9 domaines à doigt de zinc dont quatre sont de type classique C2H2 et cinq de type C2HC. Ce sont ces 5 derniers qui vont interagir spécifiquement avec le domaine à doigt de zinc N-terminal de GATA-1 (80). L'interaction FOG1-GATA1 joue un rôle crucial dans l'érythropoïèse car ils sont tous les deux exprimés dans les érythroblastes et les mégacaryocytes de souris embryonnaires et adultes et les souris invalidées pour FOG1 montrent une létalité embryonnaire liée à une anémie sévère (79). En clinique, une mutation de GATA1 chez les patients, entraîne un défaut d'association avec FOG1 à l'origine d'un décès avant la naissance s'ils n'ont pas de transfusion de globules rouges *in utero* (81). Chez le poisson-zèbre, *fog1* est exprimé dans les progéniteurs érythroïdes primitifs en même temps que *gata1* et son expression est nécessaire pour l'érythropoïèse primitive (82).

Le facteur de transcription EKLF ou KLF1 (Erythroid Kruppel-like factor) (83) possède des domaines à doigt de zinc C2H2. Il est impliqué comme GATA-1 dans de nombreux processus régulant la différenciation érythroïde terminale aussi bien lors de l'hématopoïèse primitive que définitive (84) et active également la transcription des gènes de la globine (85,86). Les souris invalidées pour le gène EKLF ont un défaut grave de l'érythropoïèse dans le foie fœtal ce qui entraîne une anémie létale embryonnaire (87). Chez le poisson-zèbre, *KLF1* nommé *k1fd* est exprimé dans les tissus érythropoïétiques tout au long du développement (88). Au total, 24 membres de la famille *k1f* exprimés dans les lignées sanguines et/ou vasculaires ont été identifiés chez le poisson zèbre (88,89).

Le facteur de transcription hématopoïétique PU.1, codé par le gène *spi1*, joue un rôle majeur pour la lignée myéloïde en permettant le développement de la lignée lymphoïde et granulomonocytaire. PU.1 bloque l'activité de GATA-1 en réprimant la différenciation érythroïde dans les cellules qui se développent vers la voie myéloïde. A l'inverse, la répression de PU.1 par GATA-1 empêche la différenciation myéloïde. *Gata1* et *PU.1/Spi1* s'inhibent donc mutuellement par liaison directe aux protéines (90,91). Un antagonisme croisé entre GATA-1 et PU.1 est également présent chez le poisson zèbre où *Gata1*, spécifique de la lignée

érythroïde, inhibe la transcription de *pu.1/spi1*, spécifique de la lignée myéloïde, et inversement (92,93).

II.2.3.3 Érythropoïétine

L'érythropoïétine (EPO) est une glycoprotéine constituée de 5 exons codant une pro-protéine de 193 acides aminés (aa) (94) qui va être clivée sous une forme active de 166 aa. Elle possède de nombreux sites de glycosylation (95,96) qui jouent un rôle important dans la biosynthèse, la sécrétion et l'affinité *in vivo* des récepteurs EPO (EPO-R) (97–99). Chez les mammifères, l'EPO est principalement produite par les cellules de la crête neurale au cours du développement et par des cellules péritubulaires interstitielles du rein chez l'adulte (100).

L'EPO est essentielle pour l'érythropoïèse définitive au cours de l'ontogenèse car elle stimule, dans la moelle osseuse, la prolifération et la différenciation des progéniteurs érythroïdes (101,102). Les souris KO pour l'EPO ou l'EPO-R meurent au quinzième jour de développement par défaut de prolifération, différenciation et survie des progéniteurs érythroïdes tardifs CFU-E ce qui entraîne des anémies sévères (103).

Elle participe également au maintien du taux d'érythrocytes en circulation chez l'adulte. En condition d'hypoxie, l'EPO, via une séquence consensus « Hypoxia Response Element » (HRE), est sous la dépendance stricte et fine d'un facteur transcriptionnel appelé Hypoxia Inducible Factor (HIF), acteur majeur de l'adaptation à l'hypoxie tissulaire, qui va entraîner la synthèse d'EPO (104).

L'EPO, une fois synthétisée et libérée dans le sang, se lie au récepteur de l'érythropoïétine sur les progéniteurs érythroïdes. Un changement de conformation de l'EPO-R (105) a lieu avec activation des voies de signalisation intracellulaire. Ceci permet aux protéines JAK2, fixées à chaque récepteur, de devenir adjacentes les unes aux autres (106) entraînant par phosphorylation la transactivation de JAK2 (107). Cette activation de JAK2 permet la phosphorylation de chaque récepteur de l'EPO sur lequel plusieurs protéines vont se lier comme le transducteur de signal et l'activateur du facteur de transcription 5 (STAT5), la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) ou la Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) (108).

Ces médiateurs sont responsables de l'effet de prolifération, de survie par inhibition de l'apoptose et de différenciation de l'EPO (109,110).

L'EPO et l'EPO-R sont également présents chez le poisson zèbre. En 2007, Paffett-Lugassy et son équipe (111) ont montré que la fonction des gènes érythropoïétiques *epo* et *epor* du

poisson zèbre est similaire à celle des mammifères malgré une identité de séquence modérée de l'*epo* et de l'*epor* du poisson zèbre par rapport à leurs orthologues de mammifères. En effet, chez le poisson zèbre, une régulation à la hausse de l'ARNm d'*epo* dans le cas d'une anémie et d'une hypoxie a été observée, ainsi que la présence d'une érythrocytose dans les cas de surexpression de l'Epo par injection d'ARNm d'*epo* dans des embryons de poisson zèbre au stade 1-cellule et de la présence de défauts dans l'érythropoïèse lors du blocage de l'ARNm *epor* par l'utilisation d'un morpholino. Enfin, l'érythropoïèse primitive du poisson zèbre est également dépendante de l'Epo contrairement aux mammifères et l'expression de l'Epo du poisson zèbre se trouve dans le cœur adulte (111,112).

II.3 Mutants érythropoïétiques de poissons zèbres et maladies humaines associées

Au cours des trois dernières décennies, le poisson-zèbre est devenu un modèle de choix pour l'étude des processus biologiques au cours du développement et de l'homéostasie et de l'hématopoïèse (113,114). Bien que les modèles d'invertébrés comme la drosophile (*Drosophila melanogaster*) (115) ou le nématode (*Caenorhabditis elegans*) (116) aient été inestimables dans l'étude de l'embryogenèse, ces organismes ne sont pas adaptés pour l'étude de l'hématopoïèse ou de la fonction des cellules sanguines matures. L'aptitude du poisson zèbre au criblage génétique et chimique (117,118) à grande échelle associée à la transparence des embryons fécondés *ex-vivo* facilitent les manipulations génétiques et l'imagerie *in vivo* des pathologies.

La majorité des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation hématopoïétique chez les mammifères ont des orthologues chez le poisson zèbre laissant supposer une conservation des mécanismes de régulation de cette différenciation et ce malgré des sites d'hématopoïèse très différents chez les poissons (119) et les mammifères (19,120).

Comme les globules rouges sont les premières cellules à apparaître dans le sang au cours de l'embryogenèse, l'étude de l'érythropoïèse fournit un point d'entrée important dans la biologie du développement et l'hématopoïèse (121).

De nombreux facteurs qui régulent l'érythropoïèse primitive et définitive sont conservés entre l'homme et la souris (111). La fonction des gènes érythropoïétiques du poisson zèbre est similaire à celle des mammifères, notamment les facteurs de transcription, l'érythropoïétine et le récepteur de l'EPO (111), les enzymes de la biosynthèse de l'hème, les hémoglobines, les protéines membranaires de l'érythrocyte (18).

Certains mutants ont permis de mieux appréhender le mécanisme de l'érythropoïèse comme les mutants *vlad tepes*, *bloodless*, *moonshine* et *cloche*.

Le mutant *moonshine* est porteur d'une mutation du facteur intermédiaire transcriptionnel 1 γ (TIF1 γ) (24,122), acteur essentiel dans la différenciation érythroïde précoce. Ce mutant se caractérise par une atteinte de l'érythropoïèse primitive, avec une disparition de l'expression de *gata1* à 18hpf, et de l'érythropoïèse définitive chez les quelques poissons qui survivent. La maturation des cellules érythroïdes est bloquée au stade de pro-érythroblastes mais les autres lignées sanguines semblent normales chez ce mutant. Quant au mutant *cloche* (123), il porte une mutation du gène *npas4l*, qui code un domaine PER-ARNT-SIM(PAS) contenant un facteur de transcription bêta-helix-loop-helix (124). Il se caractérise par une absence de la majorité des cellules endothéliales ainsi que de la plupart des cellules sanguines avec une forte diminution de *gata1* pendant l'érythropoïèse primitive et définitive.

D'autres mutants ont été générés chez le poisson-zèbre par mutagenèse en utilisant l'éthylnitrosourée (ENU) qui a entraîné des troubles érythrocytaires similaires aux maladies humaines telles que différentes formes d'anémie : anémie hémolytique, anémie sidéroblastique congénitale, sphérocytose héréditaire et hémochromatose de type IV entre autres (125).

En effet, le mutant *sauternes* présente une mutation du gène codant la δ -aminolevulinate synthase (*alas2*) qui se caractérise par une baisse de l'expression du gène β -globine et un retard de maturation des érythrocytes dans les embryons. Ce mutant présente des effets similaires à l'anémie sidéroblastique congénitale humaine (126) et a représenté le premier modèle animal permettant d'étudier les mécanismes sous-jacents à la synthèse de la globine induite par l'hème. Le mutant *Weissherbst* possède des mutations au niveau des gènes codant les protéines membranaires ayant un rôle dans le transport du fer. Ce mutant, chez le poisson zèbre, a révélé des mutations dans un nouveau transporteur du fer, appelé Ferroportine 1 (127), mutations qui ont été identifiées plus tard chez des patients atteints d'hémochromatose de type IV (128,129). Le mutant *riesling* est porteur d'une mutation du gène de la spectrine β , dont la protéine est une des plus abondantes du cytosquelette des érythrocytes. Cette mutation entraîne une anémie due à une hémolyse des érythrocytes, semblable à ce qui est observé chez l'homme dans le cas des sphérocytoses héréditaires (130). L'analyse de ce mutant a mis en évidence un nouveau mécanisme d'hémolyse des érythrocytes (130). Le mutant *merlot* possède une mutation du gène *epb41b* codant une protéine membranaire 4.1R, qui permet

l'ancrage du complexe spectrine-actine au niveau du cytosquelette de la membrane érythrocytaire (131). Ce mutant entraîne une anémie hémolytique avec des symptômes similaires à ceux observés dans l'elliptocytose héréditaire chez l'homme (131). Enfin, le mutant *retsina* possède une mutation dans l'orthologue du poisson zèbre du gène de la bande 3, dont la protéine est présente dans la membrane des érythrocytes humains (132). Les défauts observés ressemblent à ceux de l'anémie dyserythropoïétique congénitale de type II humaine (133).

Par conséquent, ces nombreux mutants montrent que l'utilisation du poisson zèbre constitue un modèle privilégié dans l'étude de l'érythropoïèse, susceptible d'ouvrir de nouvelles voies dans la compréhension des mécanismes de régulation de l'hématopoïèse et par conséquent de proposer de nouvelles approches thérapeutiques.

III. HSF1 et la réponse au stress thermique

L'organisme vivant est capable de s'adapter dès lors qu'il est soumis à des conditions anormales qui modifient son équilibre physiologique. Ces stimuli peuvent être le résultat d'un stress environnemental (choc thermique, rayonnements UV, stress oxydatif), chimiques (métaux lourds, pesticides, agents anti-cancéreux) ou physiopathologiques (réponse immunitaire et inflammatoire).

La réponse au choc thermique ou heat shock response a été découverte de façon fortuite chez la drosophile par Ritossa en 1960 (134). Cette réponse est universelle et conduit à l'expression des protéines de choc thermique ou Heat Shock Proteins (HSPs) (135) qui ont pour rôle majeur de donner aux protéines mal repliées ou anormales suite au choc thermique une conformation tridimensionnelle adéquate.

En condition de stress, la capacité de l'organisme à répondre au choc thermique *via* l'expression des HSPs (136) dépend de l'activité d'un facteur de transcription appelé « Heat Shock Factor » (HSF). L'activation d'HSF va permettre sa liaison à une région d'ADN spécifique située sur le promoteur des gènes *HSPs*, aussi appelé élément de réponse au choc thermique ou « heat shock elements » (HSE) qui se présente sous forme d'au moins 3 répétitions inversées de la séquence nGAAn (136,137). La liaison de la protéine HSF sur les HSE va entraîner la transcription des gènes *HSP* et par conséquent la synthèse des HSPs qui corrige les altérations morphologiques.

III.1 La famille des facteurs de transcription HSF

Chez les vertébrés, plusieurs membres de la famille des HSF ont été mis en évidence contrairement à la levure (138) et la drosophile (139), où il existe un gène unique qui code HSF. La famille des HSF chez les mammifères est composée de quatre membres : HSF1, HSF2, HSF3 et HSF4. Pendant longtemps, il a été pensé que le facteur HSF3 était présent uniquement chez les oiseaux (140) mais il a été retrouvé chez la souris (141). HSF1 humain et souris partagent environ 84% d'identité de séquence tandis que HSF2 et HSF4 partagent respectivement 88% et 79% d'identité de séquence d'acides aminés (142).

III.1.1 HSF1

HSF1 est le principal régulateur des réponses au choc thermique chez les mammifères *via* l'expression de protéines de choc thermique (143) qui vont assurer le maintien de l'intégrité cellulaire.

Au cours des dernières années, les nouvelles techniques d'étude du génome (144) ont révélé que de nombreux gènes non-HSP sont également sous le contrôle de HSF1 (145–149).

En conséquence, en plus d'apporter une réponse adaptative au choc thermique permettant une thermotolérance, HSF1 a été impliqué dans plusieurs processus biologiques fondamentaux indépendants de la réponse à une condition de stress, notamment le métabolisme, la gamétogenèse (150), le développement du cerveau et le maintien de la protéostase dans le système nerveux central (147,151,152), la mise en place des organes sensoriels, la réponse immunitaire (153,154) et inflammatoire (155). En effet, des souris, déficientes en HSF1 (*Hsf1*^{-/-}), peuvent survivre jusqu'à l'âge adulte mais présentent de multiples défauts phénotypiques avec notamment une létalité prénatale élevée, un retard de croissance, une stérilité féminine et l'absence de « réponse classique » au choc thermique (155).

Depuis une dizaine d'années, HSF1 est désormais reconnu comme jouant un rôle dans de nombreux domaines de la biologie des tumeurs et des taux élevés d'HSF1 sont généralement associés à un mauvais pronostic chez le patient (156). En effet, alors que la réaction au choc thermique est associée au cancer depuis des décennies, la première mention d'HSF1 ayant un impact dans le développement du cancer a été faite pour le cancer de la prostate (157). *In vivo*, des modèles de souris *Hsf1*^{-/-} (158) présentent une incidence de tumeurs plus faible et un taux de survie plus élevé que leurs homologues de type sauvage dans un modèle porteur d'une mutation oncogène de p53 ou dans un modèle chimique classique de carcinogenèse cutanée. *In vitro*, HSF1 favorise également la prolifération et la survie de cellules tumorales dans des lignées de cellules cancéreuses humaines (159–161). Par la suite, il a été démontré que HSF1 jouait un rôle dans l'expression de nombreux cancers comme les cancers colorectaux, du sein, les lymphomes, les carcinomes hépatocellulaires, les cancers buccaux, les mélanomes, les cancers du pancréas, les cancers gynécologiques (156).

III.1.2 HSF2

HSF2 est présent, comme HSF1, chez l'ensemble des vertébrés. Il se trouve, en condition normale, sous forme de dimère dans le cytoplasme des cellules mais contrairement à HSF1, HSF2 est exprimé uniquement dans les tissus et les cellules (145).

HSF2 est capable d'interagir avec HSF1 *via* leurs domaines en spirale adjacents à leurs domaines de liaison à l'ADN (162) et de réguler l'expression des protéines de choc thermique en condition de choc thermique.

HSF2 joue un rôle essentiel dans la spermatogenèse, la fertilité féminine, le développement précoce et la différenciation des cellules érythroleucémiques humaines K562 (150,163–165). Des souris déficientes en HSF2 (*Hsf2*^{-/-}), viables sur le plan embryonnaire, présentent également des anomalies cérébrales et un lien a été fait entre HSF2 et la neurodégénérescence à partir d'un modèle murin *Hsf2*^{-/-} R6/2 de la maladie de Huntington (163).

III.1.3 HSF3

Pendant longtemps, il a été pensé que le facteur HSF3 était présent uniquement chez les aviaires et notamment le poulet (140) mais il a été retrouvé chez la souris. HSF3 serait impliquée dans la réponse au choc thermique par l'expression de protéines de choc thermique non classiques de type PDZK3 et PROM2 impliquées dans l'organisation du cytosquelette et des jonctions entre les cellules (141).

III.1.4 HSF4

En condition normale, HSF4 se trouve sous la forme d'un trimère constitutivement lié à l'ADN et elle ne possède pas de domaine répresseur de la trimérisation (HRC), contrairement à HSF1 et HSF2.

HSF4 possède deux isoformes HSF- α et HSF- β issues d'un épissage alternatif (166) mais seul HSF- β est capable de réguler l'expression de gènes impliqués dans le développement (136). HSF4- α va réguler négativement HSF2 en diminuant son expression et en inhibant par liaison directe l'activité transcriptionnelle de HSF2 au niveau du promoteur *hsp70* (167).

HSF4 n'est pas impliqué dans les réponses aux chocs thermiques (168) mais joue le rôle de modulateur au niveau des organes sensoriels dans le développement du cristallin et dans la maintenance de l'épithélium olfactif (145) en coopération avec HSF1. Des études ont montré

que des mutations d'HSF4 sont corrélées avec le développement de la cataracte chez l'homme (169–172).

III.2 La structure de la protéine HSF1

En condition normale, HSF1 est sous forme monomérique dans les cellules. En condition de stress, HSF1 est capable de se lier à l'ADN après passage de l'état monomérique à l'état trimérique. L'ADN subit de nombreuses modifications post-traductionnelles.

La protéine HSF1 est composée de 4 domaines principaux (**Figure 10**) qui vont jouer un rôle important dans la régulation et l'activité d'HSF1 au cours de la réponse au stress thermique :

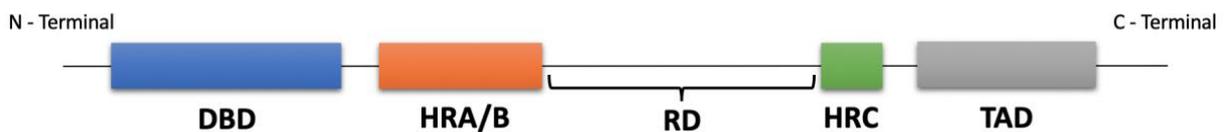


Figure 10 Structure d'HSF1

Légende : DBD : domaine de liaison à l'ADN, HRA/B & HRC : domaine de trimérisation, RD : domaine de régulation, TAD : domaine de transactivation

- Le domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain ou DBD) : correspond au domaine le mieux conservé à travers tous les HSFs ; il est situé en N-terminal et constitué d'une structure en hélice-boucle-hélice (173). Il n'y a pas d'interaction entre l'ADN et la boucle du domaine DBD d'HSF1 mais celle-ci stabilise le trimère d'HSF1 lié à l'ADN par des interactions protéine-protéine (174).

Entre le domaine DBD et le domaine de trimérisation, se trouve la région de liaison (« linker domain ») qui module la trimérisation d'HSF1 en fonction du choc thermique (175) et est capable de fermer le DBD par des interactions hydrophobes.

- Le domaine de trimérisation (TRIM), situé juste après le DBD, comprend deux sous-domaines hydrophobes : HRA et HRB (176) Ces 2 répétitions hydrophobes garantissent la trimérisation d'HSF1.
- Le domaine de régulation (RD) contrôle le domaine d'activation. En condition normale, il joue le rôle de contrôle négatif sur le domaine de transactivation (TAD) mais en condition de stress, il va permettre l'activation du TAD (177).

La trimérisation spontanée est supprimée par un troisième sous-domaine HRC présent entre le RD et le TAD. En condition normale, HRC est replié sur les sous-domaines HRA et HRB

empêchant la trimérisation d'HSF1 (178). Un changement conformationnel, en condition de stress, libérerait les sous-domaines HRA et B du domaine HRC permettant ainsi la trimérisation d'HSF1.

- Le domaine de transactivation (TAD), situé sur la partie extrême de la région C-terminal, facilite l'activité de transcription des gènes cibles et régule le niveau d'activation d'HSF1 (177,179).

III.3 La régulation de l'activité d'HSF1

En l'absence de stimulation, HSF1 se trouve dans le cytoplasme sous forme de monomère inactif.

Cette forme inactive est le résultat d'une part de l'interaction d'HSF1 avec un complexe multi-chaperonnes constitué de HSP90, p23 et immunophiline FKBP52 qui empêchent sa trimérisation en le séquestrant (180) et d'autre part, des HSPs en excès (HSP70, HSP40). L'interaction du sous-domaine HRC avec les sous-domaines hydrophobes HRA et HRB d'HSF1 participe également à l'inactivation d'HSF1.

Lors d'un stress (**Figure 11**), HSF1 passe d'un état de monomère inactif à un état de trimère actif et s'accumule dans le noyau. L'activation du facteur de transcription HSF1 est un processus multi-étape, d'autres éléments activateurs comme le facteur DAXX (« Death domain associated protein ») (181), la protéine CHIP (Carboxy terminus of the Hsc-70-Interaction Protein) (182), mais aussi les protéines co-activatrices ASC-2 (Activating Signal Co-integrator 2) (183), entrent en jeu dans l'activation d'HSF1 en parallèle de la trimérisation.

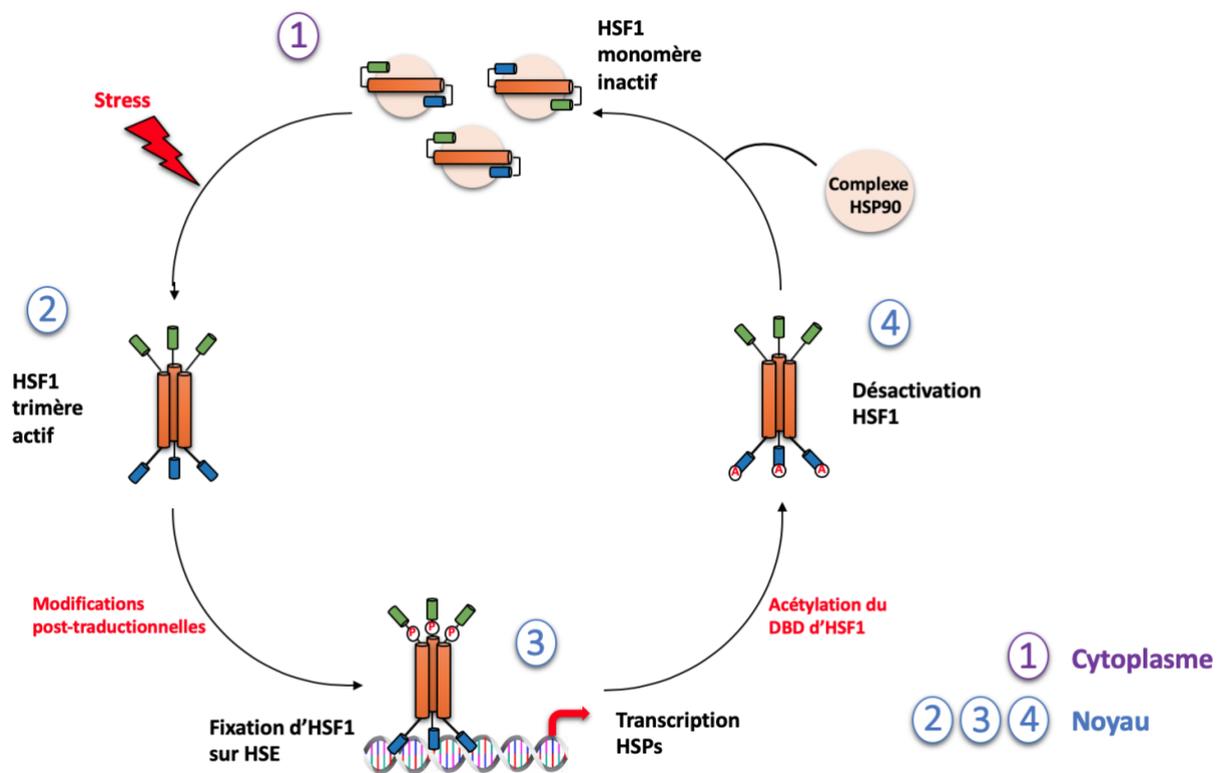


Figure 11 Représentation schématique de la réponse au stress par HSF1 chez les vertébrés (145)

Après activation, le domaine de régulation d'HSF1 peut subir des modifications post-traductionnelles sous forme de sumoylation, d'acétylation et de phosphorylation (181,184).

Dans le noyau, les trimères d'HSF1 *via* leur domaine DBD se fixent au niveau des séquences spécifiques HSE situées sur les promoteurs des gènes *HSPs*. La liaison d'HSF1 aux HSE va permettre la synthèse des HSPs

Les HSPs agissent dans la cellule telles des chaperonnes moléculaires afin de réguler l'homéostasie, de promouvoir la survie cellulaire et de réparer les dommages protéiques.

Dès lors que la quantité de protéines mal repliées retournent à un niveau normal, HSF1 est recapturée et réprimée par les protéines HSPs en excès constituant une boucle de rétrocontrôle (180). De même, la protéine HSBP1 est un régulateur négatif : elle inhibe la capacité de transactivation d'HSF1 par action sur sa forme trimérique (185).

III.4 Les protéines de choc thermique

Les HSPs sont classées en fonction de leur masse moléculaire. Chez les mammifères, on distingue les grandes HSPs de type HSP110, HSP90, HSP70 et les petites HSPs ou small heat shock proteins (sHSP) de type HSP27 dont le poids moléculaire varie entre 15 et 30 kDa.

Ces protéines peuvent être exprimées de façon constitutive ou induite dans différents compartiments cellulaires et indépendamment ou non de l'Adénosine TriPhosphate (ATP).

Nous aborderons ici uniquement les HSPs ayant à ce jour un rôle dans l'hématopoïèse (186) : HSP90, HSP70 et HSP27.

III.4.1 HSP90

La famille HSP90, représentée par 5 sous-familles, est fortement conservée au cours de l'évolution et est retrouvée dans la quasi-totalité des organismes à l'exclusion des archéobactéries.

HSP90 est une protéine chaperon et ATP dépendante (187). En condition normale, elle représente environ 1% des protéines totales et elle peut augmenter jusqu'à 3-5% en condition de stress.

Au niveau intracellulaire, en condition normale, HSP90 permet la stabilité, la régulation et l'activation de protéines ou de complexes protéiques (188) impliqués dans la croissance cellulaire, la prolifération ou la survie. Parmi les nombreuses protéines clientes avec lesquelles HSP90 interagit, nombreuses sont celles impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et la transduction du signal (AKT, RAF-1) mais certaines protéines jouent également un rôle dans le développement des néoplasies (189) tels que des médiateurs de l'apoptose (Bcl-2, Apaf-1), des gènes suppresseurs de tumeur (p53), des facteurs de transcription (HSF1, HIF-1). En condition de stress, HSP90 participe à la maturation et au repliement correct des protéines anormales.

Au niveau extracellulaire, HSP90 serait impliquée dans de nombreux processus physiologiques comme l'angiogenèse (190) ou l'activation des monocytes et des macrophages (191) mais également au niveau de processus pathologiques avec l'invasion tumorale (192).

III.4.2 HSP70

La famille HSP70 (HSP70s), constituée de 10 membres chez l'homme, représente l'une des familles protéiques la plus conservée au cours de l'évolution allant des bactéries aux plantes et jusqu'à l'homme (193).

Comme HSP90, HSP70 est un chaperon moléculaire dépendant de l'ATP (194). Il est actif sous forme monomérique dans la cellule et son activité dépend de l'ATP et de sa localisation cellulaire qui peut être extracellulaire, membranaire ou intracellulaire.

Dans le milieu intracellulaire, en condition normale, HSP70 exerce sa fonction de chaperon moléculaire en assistant les protéines néo-synthétisées, en participant à l'assemblage de complexes protéiques et en permettant le transport de protéines à travers les membranes cellulaires (195). Outre son rôle de chaperon moléculaire, HSP70 possède également des fonctions immunologiques (196) et joue un rôle dans l'inhibition du processus de mort cellulaire par apoptose (197).

En condition de stress, HSP70 s'accumule dans les cellules et se lie aux protéines dénaturées pour permettre la survie et le maintien des fonctions cellulaires.

Dans le milieu extracellulaire, HSP70 est retrouvée sous deux formes : une forme libre et une forme liée aux membranes (182) et possède des fonctions immunologiques et immunomodulatrices (196).

III.4.3 HSP27

La famille des sHSP, composée de 10 membres, fut l'une des toutes premières familles de HSPs découvertes (135).

HSP27 est une protéine chaperon ubiquitaire (198), indépendante de l'ATP. Elle est capable de s'oligomériser et son organisation structurale dépend entre autres de son statut de phosphorylation qui peut être modifié par des agents chimiques ou par des conditions de stress (199).

Dans le milieu intracellulaire, en condition normale, HSP27 est constitutivement localisée dans le cytosol où elle participe aux processus de différenciation cellulaire en contrôlant directement la prolifération et le cycle cellulaire et en jouant sur la réponse inflammatoire (200).

En condition de stress, HSP27 est redistribuée dans la cellule notamment vers le noyau (199) afin de séquestrer les protéines dénaturées. Les protéines sont ensuite prises en charge par des protéines dépendant de l'ATP (HSP70, HSP90) afin d'être renaturées.

Dans le milieu extracellulaire, HSP27 joue un rôle dans l'angiogenèse et la croissance tumorale (201,202).

III.5 HSF1, HSP90, HSP70, HSP27 et l'hématopoïèse

HSF1 régule non seulement l'expression des gènes de choc thermique en réponse au stress, mais elle est également impliquée dans le développement, en régulant les gènes qui ne sont pas liés au choc thermique. De plus, les protéines de choc thermique (HSP90, HSP70 et HSP27), en plus de leur rôle cytoprotecteur en conditions de stress, sont impliquées dans des voies de différenciation spécifiques.

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses études montrent l'impact de ces facteurs sur les voies de signalisation hématopoïétique et leur participation au maintien de pathologies hématopoïétiques, en condition de stress ou non.

III.5.1 HSF1

En 2014, Jego et son équipe (203) ont montré que la délétion d'HSF1 affecte la différenciation des cellules de la moelle osseuse de souris induite par M-CSF. HSF1 aurait un double rôle sur SPI1/PU.1, facteur de transcription essentiel à la différenciation des macrophages et dont la dérégulation peut entraîner le développement de leucémies et de lymphomes comme la leucémie myéloïde aiguë ou le lymphome à cellule T (204–206).

Dans un premier temps, HSF1 régule l'expression du gène *SPI1/PU.1*. En outre, une diminution de l'expression ou une inhibition d'HSF1 altère la transcription des gènes ciblés par SPI1/PU.1 et la différenciation des macrophages.

Dans un deuxième temps, HSF1 induit l'expression de HSP70 qui interagit avec SPI1/PU.1 pour protéger le facteur de transcription de la dégradation protéasomique.

Ainsi, HSF1 régulerait finement l'expression de SPI1/PU.1 au niveau transcriptionnel et post-traductionnel pendant la différenciation des monocytes en macrophages.

En 2019, Aifantis et son équipe (207) ont montré que l'expression d'HSF1 et des protéines de choc thermique (HSP90 et HSP70) était significativement plus élevée dans les échantillons de patients atteints de leucémie lymphoblastique aiguë à cellules T (LAL-T) et *in vitro* dans des lignées cellulaires LAL-T par rapport aux cellules T normales. Néanmoins, HSF1 serait uniquement nécessaire à la viabilité des cellules leucémiques et n'aurait pas d'impact sur le développement normal des lymphocytes T au niveau des cellules souches hématopoïétiques ce qui peut suggérer une fenêtre thérapeutique potentielle pour le ciblage futur de HSF1 dans le traitement de la leucémie.

En 2020, Zhao et son équipe (208) ont montré que l'expression du gène γ -globine est significativement diminuée *in vitro* dans des cellules érythroleucémique K562 après le knockdown d'HSF1 au cours des stades de développement érythroïde du fœtus et de l'adulte, en condition ou non de choc thermique. En plus de réguler l'expression du gène de la γ -globine, HSF1 régulerait également le gène de la β -globine dans les stades de développement érythroïde de l'adulte. HSF1 se fixe directement sur le site HS3 de la région LCR des gènes de la globine de type β .

III.5.2 HSP90

HSP90 est une protéine chaperonne de JAK2 (209). Dans les néoplasies myéloprolifératives comme la polyglobulie de Vaquez (PV), HSP90 favorise le maintien de la protéine mutée JAK2 au niveau des récepteurs à l'EPO. Plusieurs études (209,210) ont montré qu'une inhibition d'HSP90 entraîne une diminution de la prolifération et une apoptose des cellules JAK2 mutées associées à une atténuation des voies de signalisation JAK-STAT.

En 2018, Ghosh et son équipe (211) ont montré qu'HSP90 participe avec AHSP (α -Hb – stabilizing protein) à la génération de tétramères d'hémoglobine fonctionnels pendant l'érythropoïèse. En effet, HSP90 se lie à l'Hb- γ ou à l'Hb- β immature et sans hème, puis dirige le processus d'insertion de l'hème dans l'Hb, puis HSP90 se dissocie des Hb pour permettre la formation d'un hétérotétramère avec l'Hb- α .

III.5.3 HSP70

L'érythropoïétine est le principal régulateur de l'érythropoïèse en participant au contrôle de survie, de prolifération et de différenciation des progéniteurs érythroïdes. Le facteur de transcription érythroïde GATA-1 joue, lui, un rôle majeur dans la régulation de plusieurs lignages, au cours de la différenciation hématopoïétique.

Au cours de la différenciation érythroïde, certaines caspases sont également activées comme la caspase 3 qui est nécessaire pour la maturation terminale des érythroblastes *via* l'activation de protéines, la LAMINE B et ACINUS (212).

En 2007, Hermine et son équipe (213) ont montré que la protéine HSP70 protège, en présence d'EPO, GATA-1 du clivage par les caspases au niveau du noyau permettant la différenciation des cellules érythroïdes. En effet, en l'absence d'EPO, HSP70 est délocalisée dans le cytoplasme

entraînant une perte de protection de GATA-1 qui est alors clivé par la caspase 3 entraînant l'apoptose des érythroblastes.

Dans les syndromes myélodysplasiques (SMD) de bas grade, on observe une diminution de la concentration nucléaire d'HSP70 alors même que sa concentration dans le cytoplasme est augmentée. Cela est dû à l'excès de sortie d'HSP70 du noyau vers le cytoplasme qui entraîne un défaut nucléaire de GATA-1 (214).

En 2013, Martinez-Lopez et son équipe (215), après une analyse protéomique de cellules granulocytaires chez des patients porteurs de néoplasies myéloprolifératives, ont montré que HSP70 était surexprimée chez les patients porteur d'une polyglobulie de Vaquez (PV) par rapport aux patients porteurs d'une thrombocytémie essentielle, mutés *JAK2*. L'utilisation d'inhibiteurs, spécifiques d'HSP70, a permis d'entraîner une apoptose de colonies de cellules érythroïdes de patients PV.

En 2014, Hermine et son équipe (216) ont montré qu'un excès en globine α dans les β -thalassémies entraîne un passage de la protéine HSP70 du noyau au cytoplasme. Les patients atteints de β -thalassémies présentent un défaut de synthèse des globines β entraînant un défaut quantitatif en chaînes β et un excès relatif en chaînes α . Dans le cytoplasme, HSP70 se lie avec une forte affinité aux globines α libres entraînant une réduction de la toxicité des agrégats de globine α . Le passage d'HSP70 du noyau au cytoplasme entraîne une dégradation de GATA-1 au niveau nucléaire ayant pour conséquence un défaut de la maturation érythroïde. La mise en évidence d'un rôle d'HSP70 dans l'érythropoïèse peut être une nouvelle option thérapeutique pour notamment améliorer l'érythropoïèse inefficace dans les β -thalassémies (217).

III.5.4 HSP27

En 2010, Garrido et son équipe (218) ont montré dans deux modèles de différenciation érythroïde *in vitro*, lignées érythroleucémiques K562 induites par l'hémine et cellules CD34+ induites par l'EPO, qu'une déplétion en HSP27 entraînait une accumulation de GATA-1 bloquant la différenciation érythroïde. En condition normale, HSP27 pénètre dans le noyau sous forme phosphorylée et entraîne par liaison à GATA-1, son ubiquitination et sa dégradation protéasomique. En conséquence, HSP27 joue un rôle dans le contrôle de la différenciation érythroïde terminale par la régulation de l'activité de GATA-1.

En 2018, Sevin (219) a montré que l'inhibition spécifique de HSP27 par l'OGX-427 dans des modèles murins, limite la progression de la myélofibrose qui est une néoplasie myéloproliférative et affecte également la voie de signalisation JAK2/STAT. HSP27 jouerait ainsi un rôle clé dans la physiopathologie de la myélofibrose et représenterait une nouvelle cible thérapeutique potentielle pour les patients atteints de néoplasies myéloprolifératives.

III.6 La réponse au stress thermique chez le poisson zèbre

III.6.1 HSF

Aujourd'hui, quatre facteurs de transcription de la réponse au choc thermique ont été décrits dans le génome du poisson zèbre : Hsf1 (220), Hsf2 (221), Hsf4 (222) et Hsf5 (223).

Le facteur de transcription de choc thermique *HSF-1* a été identifié dans les années 2000 chez le poisson zèbre et son gène est noté *hsf-1* (220). Il est également constitué du domaine de liaison à l'ADN contenu dans la partie N-terminale et des domaines de répétitions hydrophobes HRA/B et HRC.

Le gène *hsf1* est situé sur le chromosome 19 en position 3 056 450 – 3 082 268. Il est constitué de 13 exons pour une longueur totale de 5951pb. La protéine issue de la traduction du gène a une longueur de 497 acides aminés (aa).

La comparaison de séquence de *hsf-1* aux séquences de *HSF-1* de l'homme et de *Hsf1* de la souris montre une forte conservation du domaine de liaison à l'ADN entre ces espèces (**Tableau 1**).

	Pourcentage d'identité en acide aminé (%)		
	zDBD <i>hsf1</i>	zHRA/B <i>hsf1</i>	zHRC <i>hsf1</i>
<i>HSF1</i> (humain)	91	76	43
<i>Hsf1</i> (souris)	91	75	43

Tableau 1 Comparaison de la séquence de *hsf-1* du poisson zèbre avec celles de l'homme et de la souris en pourcentage d'identité des acides aminés (220)

Légende : zDBD : DNA-binding domain du poisson zèbre, zHRA/B : Heptad repeat A/B du poisson zèbre, HRC : Heptad repeat C du poisson zèbre, *hsf1* : *hsf1* poisson zèbre, *HSF1* : *HSF-1* humain, *Hsf1* : *Hsf-1* souris.

Chez le poisson zèbre, il existe deux isoformes de *hsf1*, *hsf1a* et *hsf1b* qui diffèrent par l'insertion d'une séquence de 26 acides aminés adjacente à la partie N-terminale du domaine HR/C dans l'isoforme b (220) (**Figure 12**). Lors d'un choc thermique, la forme épissée la plus longue de *hsf1*, *hsf1b* n'est plus exprimée dans le foie et les branchies contrairement à *hsf1a*.

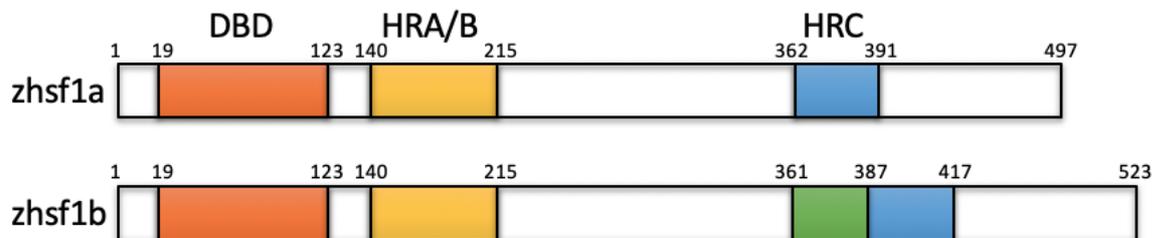


Figure 12 Présentation schématique des deux isoformes de *hsf1* chez le poisson zèbre (144)
Légende : DBD : domaine de liaison à l'ADN, HRA/B & HRC : domaine de trimérisation, ■ : Séquence de 26 acides aminés supplémentaires

L'utilisation d'un morpholino (MO), ciblant l'ARNm de *hsf1* (*hsf1*-MO), a été réalisée pour examiner le rôle de *hsf1* dans le développement du poisson zèbre (224,225). Un MO est un oligonucléotide anti-sens de 20 paires de base environ chimiquement modifié et utilisé pour inhiber l'expression d'un gène durant les premiers jours de développement soit en bloquant la traduction de la protéine cible ou en modifiant l'épissage du pré-ARNm.

Le poisson zèbre est normalement maintenu à 28,5 ° C et le choc thermique est réalisé à 37°C pendant 1 heure dans un bain d'eau. Après un choc thermique et injection du MO anti-*hsf1*, une réduction sévère de l'expression d'*hsp70* et une augmentation du nombre de cellules apoptotiques ont été observées (224).

Les embryons dépourvus de *hsf1* présentaient également un œil de taille diminuée caractérisé par une structure rétinienne désorganisée et un cristallin immature à l'origine d'une microphthalmie. Des études supplémentaires ont montré que le gène *hsf1* était impliqué dans la régulation de l'expression constitutive de *hsp70* chez le poisson zèbre et que la régulation de l'expression du gène *hsp70* par *hsf1* est importante pour le développement de l'œil du poisson zèbre (225,226).

Hsf2 du poisson zèbre possède 70 % d'identité avec l'HSF2 humain lors de l'alignement des acides aminés des deux protéines (221). L'utilisation de MO dirigé contre le gène *hsf2* n'a

montré aucun effet sur le développement de l'œil contrairement au MO anti-*hsf1*. A l'inverse, les profils d'expression des gènes *hsf1* et *hsf2* étaient semblables au niveau cérébral durant le développement en condition de stress ou non (221).

Hsf4 du poisson zèbre possède un DBD ayant un pourcentage d'identité plus élevé avec le DBD de Hsf1 qu'avec le DBD d'HSF4 des mammifères (220) laissant suggérer que les gènes cibles du facteur de transcription Hsf4 du poisson zèbre ne sont peut-être pas entièrement partagés avec ceux régulés par la HSF4 de mammifère (168). Néanmoins, comme chez les mammifères, l'expression du gène *hsf4* a été identifiée dans les tissus adultes de l'œil du poisson zèbre. En effet, le développement du cristallin chez le poisson zèbre commence avant 24 hpf tandis que l'expression du gène *hsf4* n'est détectable qu'à partir de 60hpf.

Hsf5 du poisson zèbre est principalement exprimé dans les testicules. L'invalidation de *hsf5* (*hsf5*^{-/-}) par CRISPR/Cas9 chez le poisson zèbre entraîne une stérilité chez les mâles, mais pas chez les femelles. De plus, les testicules des mutants *hsf5*^{-/-} commencent à présenter des défauts au stade de la méiose I pendant la spermatogenèse ce qui entraîne des poissons zèbres avec un faible nombre de spermatozoïdes et des défauts structurels dans leurs spermatozoïdes.

III.6.2 HSP

Les protéines de choc thermique HSP90, HSP70 et HSP27 sont également retrouvées chez le poisson zèbre (226).

En 2005, Craven et son équipe (227) ont montré dans un modèle de poisson zèbre présentant une mutation ponctuelle de la protéine Hspa9B, une protéine chaperonne de HSP70, un développement anormal des érythrocytes, des granulocytes et des progéniteurs hématopoïétiques. Le phénotype observé comprenait une anémie associée à une dysérythropoïèse et mimait des aspects pathologiques observés chez l'homme dans les myélodysplasies.

En 2011, Nagashima et son équipe (228) ont montré que *hsp70* du poisson zèbre est l'un des premiers gènes induits dans les cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) des poissons zèbres suivant une lésion du nerf optique. HSP70 participe activement à la survie cellulaire et à l'élongation axonale des CGR lors des premières étapes de la régénération du nerf optique.

L'interaction entre Hsp70 et Hsf1 chez le poisson zèbre est importante pour le développement de l'œil du poisson zèbre (225,226).

Chez le poisson zèbre, *hsp27* (229) est exprimé de manière préférentielle dans les cellules du muscle squelettique et cardiaque où il favorise l'intégrité de l'architecture des cellules musculaires et la survie dans des conditions de stress (230).

PROJET DE RECHERCHE

Objectifs

La réponse au choc thermique est un mécanisme très bien conservé dans l'évolution permettant la protection des cellules de l'organisme en condition de stress. Le facteur de réponse au choc thermique (HSF1) est le facteur de transcription principal des gènes des protéines de choc thermique (HSPs). Des études précédentes sur les HSPs ont montré que la protéine HSP27 contrôlait GATA-1 durant la différenciation érythroïde et que la protéine HSP70 d'une part régulait l'érythropoïèse en protégeant GATA-1 du clivage par la caspase 3, et d'autre part entraînait une érythropoïèse inefficace dans les β -thalassémies par séquestration par les globines α libres. Comme la transcription des gènes HSPs est contrôlée principalement par HSF1, il est légitime de penser que le gène HSF1 pourrait jouer un rôle dans l'érythropoïèse. Dans ce contexte, mon projet de thèse visait à étudier le rôle d'HSF1 dans l'érythropoïèse du poisson zèbre par :

- La création d'une lignée de poisson zèbre knock-out pour le gène *hsf1* via la technique CRISPR/CAS9
- L'analyse des érythrocytes primitifs et définitifs.

The role of *hsf1* in zebrafish erythropoiesis

Ici seront présentés les résultats obtenus au cours de ma thèse et nous ayant permis de rédiger un article original soumis à « *Blood* » en mars 2020.

L'article est présenté sous sa forme soumise le 26 mars 2020 dans les annexes du manuscrit.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Lignées utilisées et entretien des poissons zèbres

Les expériences ont été réalisées en utilisant la lignée sauvage WIK (ZIRC) et les lignées transgéniques *Tg(gata1:DsrRed)*, données par David Traver (La Jolla, USA), et *Tg(globine:GFP)*, donnée par Julien Bertrand (Genève, Suisse).

La lignée *Tg(gata1:DsrRed)* a été obtenue par clonage d'un fragment du promoteur *gata1* du poisson zèbre de 7kb dans le site de clonage du vecteur pDsRed 2-1 (Clontech) qui a ensuite été injecté au stade 1-cellule dans l'embryon du poisson zèbre puis des croisements ont été réalisés pour obtenir une lignée homozygote. La lignée *Tg(globin:GFP)* a également été obtenue par croisement après injection d'un vecteur contenant : la région de contrôle du locus (LCR) et le promoteur bidirectionnel α/β adult *globin 2* (α/β_{a2}) respectivement isolés avec une enzyme de restriction, amplifiés par PCR et clonés dans un vecteur pEGFP-1 pour créer la construction LCR- α/β_{a2} -GFP.

Ainsi, dans nos 2 lignées, la protéine fluorescente rouge (DsRed) et la protéine fluorescente verte (GFP) sont exprimées respectivement sous le contrôle du promoteur *gata1*, principalement exprimé dans les progéniteurs érythroïdes, et globine, exprimé spécifiquement dans les globules rouges.

Les poissons zèbres sont maintenus dans un système d'aquaculture à recirculation (Müller & Pflieger, Allemagne) à une température de 26-28°C. La photopériode est de 14h (lumière) et 10h (obscurité). Ils sont nourris trois fois par jour avec des granulés MicroGemma 300µm (SKRETTING).

Pour obtenir des œufs fécondés, les poissons sont appariés le soir et l'accouplement est provoqué par la lumière le lendemain matin. Les embryons sont collectés dans les 20 minutes qui suivent la ponte et placés à 28°C dans une boîte de Petri contenant du milieu E3 (5mmol/L NaCl, 0,17 mmol/L KCl, 0,4 mmol/L CaCl₂ et 0,16 mmol/L MgSO₄) avec du bleu de méthylène (Biochemika Fluka 0.006 % final) pour empêcher le développement de champignons.

II. CRISPR/CAS9

II.1. Sélection du site cible du gène HSF1

La conception des séquences cibles a été réalisée à l'aide de l'outil web en ligne CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no>). L'algorithme CHOPCHOP a été développé par Alex Schier et son équipe (Harvard, USA) (231).

Les sites cibles obtenues pour les sgARN au niveau de la structure du gène *hsf1* sont montrés avec chaque option codée par couleur selon le classement (**Annexe 1**).

II.2 Conception du sgARN

Pour la synthèse des sgARN, un oligonucléotide de 60 paires de base appelé oligo gène spécifique ou crARN a été synthétisé et contient : 1) un promoteur pour la transcription *in vitro* SP6 : ATTTAGGTGACACTATA, 2) une séquence de 20 paires de bases homologues à la séquence cible du gène *hsf1* : **GGCGAAAGGGGCGTGCCAC** (exemple de la cible n°3 sur l'exon 9), et 3) une séquence de 20 paires de bases qui va reconnaître et s'hybrider sur l'oligonucléotide constant qui est le même pour toutes les matrices sgARN :

5' **GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG** 3'.

Le crARN du gène *hsf1* possède cette séquence :

5' ATTTAGGTGACACTATA**GGCGAAAGGGGCGTGCCAC**GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG 3'

L'oligonucléotide « constant » est constitué de 80 paires de bases et possède la séquence suivante pour obtenir le tracrARN :

5' AAAAAGCACCGACTCACCGACTCGGTGCCACTTTTTTTTTCAAGTTTTGATAACGGACTAGCCTATTTAACTTGCTTTCTAGCTCTAAAAAC 3'.

II.3 Conception de la cassette oligonucléotide contenant les codons stops

La cassette oligonucléotide contenant les codons stops est constituée de trois parties :

- Une séquence de 20 paires de bases homologues à la séquence cible du gène *hsf1* en amont du point de coupure prédit pour la protéine Cas9 : CTGGGTCTGATTTGCCTGTG (exemple de la cible n°3 sur l'exon 9)
- Une cassette de 44 paires de bases contenant trois codons stops pour chaque cadre de lecture (*surligné en rouge*) : 5'-GTCATGGCGTT**TAA**ACCT**TAA****TAA**GCTGTTGTAG-3',

- Une séquence de 20 paires de bases homologue à la séquence cible du gène *hsf1* en aval du point de coupure prédit pour la protéine Cas9 : GACACGCCCTTTTCGCCAC (exemple de la cible n°3 sur l'exon 9)

La combinaison de ces séquences homologues avec la cassette donne l'oligonucléotide suivant : CTGGGTCTGATTTGCCTGTGGTCATGGCGTTTAAACCTTAAATTAAGCTGTTGTAGGACACGC CCCTTTCGCCAC.

La technique CRISPR/Cas9 va permettre l'insertion de cette séquence de façon orientée ce qui permettra l'introduction de codons STOP dans les trois phases du brin codant de l'exon 9 de *hsf1*.

II.4 Synthèse des sondes sgADN & sgARN

L'oligonucléotide SP6-cible spécifique et l'oligonucléotide constant vont s'hybrider à 95°C pendant 5 minutes via la séquence homologue de 20 paires de bases qu'ils ont en commun. L'ajout de la T4ADN Polymérase pendant 20 minutes à 12°C permet la synthèse des brins complémentaires et l'obtention des sondes sgADN. Une purification des sgADN est réalisée à l'aide de colonnes selon le protocole de genElute PCR clean up kit (SIGMA-ALDRICH).

Les sondes sgADN obtenues vont être transcrites en ARN avec le kit MEGAscript T7/SP6 kit (AMBION) puis tous les sgARN sont traités à la Turbo ADNse et incubés pendant 4h à 37°C. Les sgARN obtenus seront purifiés avec de l'Ammonium Acétate 5M et de l'éthanol (EtOH) 100% pendant 30 minutes à -80°C, puis ils seront lavés à l'EtOH 70% et repris dans 30 µL d'H₂O ARNse (eau purifiée contenant des ribonucléases). La concentration d'ARN est quantifiée à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop.

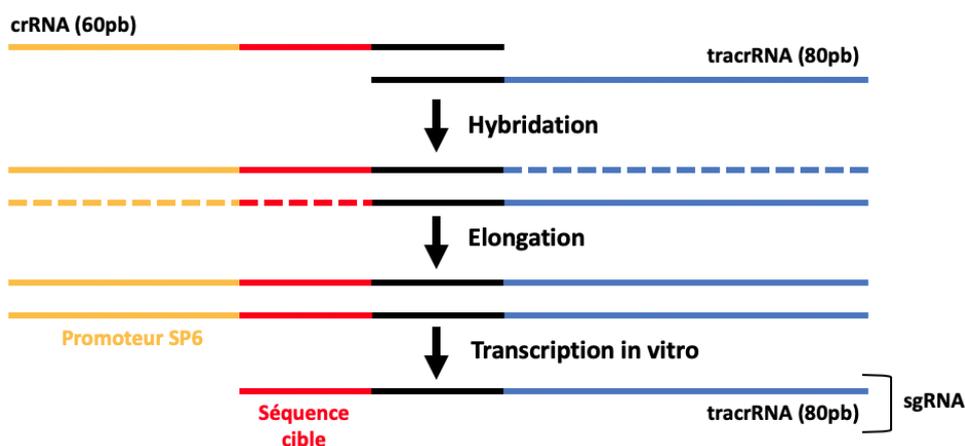


Figure 13 Diagramme explicatif pour l'obtention du sgARN constitué du crARN et du tracrARN

II.5 Injection de la protéine Cas9, du sgARN, et de la cassette oligonucléotide contenant les codons stops

La protéine Cas9 utilisée dans ce projet est la Cas9 Nuclease (NLS) de Diagenode (n°C29010001, 300pg) issu de *Streptococcus pyogenes* dont le PAM est NGG.

Le mélange de l'ensemble des éléments se réalise le jour de l'injection :

- | | |
|---|--------|
| - SgARN (200-400ng/μl) | 1 μl |
| - Protéine Cas9 (600ng/μl) | 1 μl |
| - Cassette oligonucléotide codon stop (3μM) | 1 μl |
| - Colorant d'injection rhodamine | 0,3 μl |

Ce mélange est placé à température ambiante pendant 5 minutes pour former un complexe avec la protéine Cas9 puis se conserve sur de la glace. Environ 5μl du mélange est introduit juste avant l'injection dans le capillaire d'injection (HAVARD Apparatus – 0,58mm de diamètre interne) et le volume d'injection est calibré avec une cellule de Malassez (232). Les injections dans les œufs de poisson zèbre sont effectuées sous une loupe (LEICA MZ FLIII) via un capillaire en verre relié à un micro-injecteur (EPPENDORF FemtoJet) dans la première cellule de l'embryon (stade 1-cellule).

L'objectif est d'injecter 1 nL directement dans le noyau de la cellule. Les embryons sont injectés immédiatement après le prélèvement et n'ont pas besoin d'être déchorionnés.

Quelques embryons non-injectés du même bac de ponte sont conservés comme témoin. Chaque condition est placée dans une boîte de Petri contenant de l'E3 et l'ensemble des embryons est placé dans une étuve à 28,5°C.

II.6 Suivi des poissons zèbres injectés par CRISPR/Cas9

Obtention de l'ADN génomique

1) Embryons de poissons zèbres

L'ADN génomique (ADNg) des embryons de poissons zèbres peut être obtenu dès 24-30hpf. L'extraction de l'ADN est réalisée sur un total de 10 embryons injectés, un nombre nécessaire pour avoir une quantité suffisante d'ADNg.

Les 10 embryons présents dans le tube sont transférés dans un tube PCR où ils sont chauffés, après ajout de 100 μL NaOH 50mM, pendant 20min à 95°C. Après refroidissement et ajout de 10μL TrisHCl 1M pH 8, le surnageant récupéré après centrifugation correspond à l'ADNg des poissons zèbres.

L'ensemble des ADNg des embryons de poisson zèbre est amplifié par Polymerase Chain Reaction (PCR).

2) Poisson zèbre adulte

L'ADNg des poissons zèbres adultes peut être obtenu après coupure et récupération de la nageoire caudale régénérante du poisson zèbre. Cette technique se nomme le « fin clip ».

Un bout de la nageoire caudale du poisson zèbre, préalablement anesthésié par une solution de Benzocaïne (400µL à 100mg/ml dans 800mL d'H₂O), est coupé avec une paire de ciseaux et placé dans un tube PCR. Le poisson zèbre est ensuite placé dans des bains successifs d'E3. Après son réveil, chaque poisson zèbre est numéroté et isolé dans un aquarium pour être facilement identifiable.

Chaque ADNg de poisson zèbre adulte est, par la suite, obtenu de façon séparée selon le même protocole que celui décrit pour les embryons de poissons zèbres.

Chaque ADNg de poisson zèbre adulte est amplifié séparément par PCR.

PCR

L'amplification par PCR se fait sur 5 µL d'ADN génomique mis en présence de 0.25µL de GoTaq polymérase (PROMEGA), dans un mélange réactionnel contenant 5µL de 5X GoTaq Buffer, 0,5µL de dNTPs 10mM, 1µL de Forward Primer 25µM, 1µL Reverse Primer 25µM.

Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un thermocycleur selon le programme suivant : après 5min de dénaturation à 94°C, les échantillons sont soumis à une succession de 35 cycles identiques comprenant : 30s de dénaturation à 94°C ; 30s à la température d'hybridation à T_m à 56°C et 30s d'élongation à 72°C. La réaction se termine ensuite par une élongation finale de 5min à 72°C.

Les produits PCR vont migrer sur un gel d'agarose à 2% (BIOATLAS), préparé avec du TAE 1X et contenant 0,7µL/ml de bromure d'éthidium (BET), pour vérifier l'intégrité des fragments. Les échantillons sont mélangés à un tampon de charge 10X avant d'être déposés dans les puits du gel. La migration s'effectue pendant une heure à 100 Volts dans le tampon TAE. Finalement, les bandes correspondant aux fragments d'ADN sont observées par excitation du BET sous lumière ultraviolette (Geldoc, Bio Rad). La taille de ces fragments est estimée par comparaison avec les bandes d'un marqueur de taille moléculaire (1Kb ou 100bp DNA Ladder ; INVITROGEN).

Primers PCR

Les primers sont synthétisés (Thermo Fisher) pour vérifier, par PCR, la bonne insertion de la cassette oligonucléotide codon stop suite à la coupure par la protéine Cas9.

Les primers sens se trouvent soit en amont de la séquence cible sur l'exon ou sur l'intron précédant l'exon ciblé soit directement sur l'oligonucléotide inséré qui a l'avantage d'avoir un nombre de paires de bases suffisant pour que des primers sens ou anti-sens puissent s'hybrider. Les primers anti-sens synthétisés se trouvent soit en aval de la séquence cible sur l'exon ou sur l'intron suivant l'exon ciblé soit directement sur l'oligonucléotide inséré.

Séquençage

Les produits PCR ont été séquencés chez GENEWIZ pour confirmer la bonne insertion de la cassette oligonucléotide codon stop sur les 2 brins complémentaires.

III. Analyse de l'expression des gènes

III.1 Extraction des ARN à partir des embryons et préparation d'ADNc

Environ 25 embryons sont anesthésiés avec de la Benzocaïne et placés dans 1mL d'une solution du TRIzol® Reagent (INVITROGEN) et homogénéisés à l'aide d'une seringue et d'une aiguille. 0,2mL de chloroforme/mL de TRIzol® est ajouté à l'échantillon. Après centrifugation (12000g, 4°C, 15min), la phase aqueuse est récupérée dans un nouveau tube dans lequel est ajouté 0.5mL d'isopropanol. Après une incubation de 10 minutes, l'échantillon est centrifugé (12000g, 4°C, 10min). Après élimination du surnageant, le culot est repris dans 1mL d'EtOH 75%. Une nouvelle centrifugation est nécessaire pour récupérer le culot d'ARN qui sera repris après séchage dans 40µL d'H₂O ARNse free (AMBION).

Les 40µL contenant l'ARN sont mis à incuber, après ajout de 0,1 volume de 10X TURBO DNase Buffer et de 1µL TURBO DNase, pendant 30 minutes à 37°C. Puis, 0,1 volume de DNase Inactivation Reagent (INVITROGEN) est ajouté au mélange et mis à incuber à température ambiante pendant 5 minutes. Une dernière centrifugation (10000g, 2min) permet de récupérer l'ARN.

Pour préparer 50µl d'ADN complémentaire (ADNc), 2µg d'ARN sont mélangés à 8µL de 5x Reaction Mix, 4µL de Maxima Enzyme Mix, qsp 50µL d'H₂O ARNse et mis à incuber à 37°C pendant 1h.

La concentration des ARN totaux et d'ADNc est mesurée avec un spectrophotomètre (Nanodrop).

III.2 PCR Quantitative

L'expression des gènes est étudiée par PCR quantitative, avec l'appareil ViiA7 Real Time PCR System (Thermo Fisher) à partir de 25µL de mélange réactionnel contenant : 12,5µL de SYBER Green/ROX qPCR master mix (THERMO SCIENTIFIC), 2,5µL de primer mix 3uM (sens + anti-sens), 8uL d'H₂O (ARNse free) et 2µL d'ADNc à 200ng/µL. Les différents cycles sont réalisés comme suit : dénaturation initiale pendant 10 minutes à 95°C, suivie de 40 cycles d'amplification (15 secondes à 95°C pour la dénaturation, 1 minute à 60°C pour l'hybridation, et 1minute à 60°C pour l'extension).

IV. Cytométrie en flux

IV.1 Sur cellules d'embryons

Les embryons déchorionnés sont transférés avec du milieu E3 (500µL) dans un tube (Eppendorf) de 2mL auquel est ajouté : 495µL H₂O + 5µL DTT (10mM). Ce tube est placé à l'horizontale pendant 30min. Puis, les embryons subissent 2 lavages successifs au 0,9X DPBS avec Ca²⁺ et Mg²⁺. Après avoir enlevé l'ensemble du 0,9X DPBS, 1mL de DPBS glacé avec Ca²⁺ et Mg²⁺ contenant de la Liberase TM (Concentration finale = 50mg/mL) est ajouté dans le tube. Celui-ci est placé horizontalement sur un vortex à 37°C pendant 1h00, ou jusqu'à dissolution des embryons (vérification toutes les 15min). La solution contenant les embryons dissous est diluée avec une solution SM glacé (0,9X DPBS sans Ca²⁺ ou Mg²⁺ + 5% Sérum de Veau Foetal) et la suspension cellulaire est passée à travers un filtre de 40µm au-dessus d'un tube falcon de 50 mL. Pour rincer les cellules à travers le filtre, le tube falcon est rempli de SM glacé jusqu'à 25 mL et les cellules sont centrifugées pendant 5min à 300g 4°C. Le surnageant est retiré et la suspension cellulaire est reprise avec 2-3mL de SM glacé pour être de nouveau séparée à travers un filtre de 40µm et 5ml de SM sont ajoutés avant une nouvelle centrifugation pendant 5min à 300g 4°C. Le surnageant est retiré et les cellules sont reprises avec 500µL–1mL de SM. Du FVS700 (BD Horizon; 1/10000) a été ajouté pour exclure les cellules mortes et les débris lors du passage en cytométrie en flux. Les cellules marquées des lignées transgéniques *Tg(gata1:DsRed)* et *Tg(globin:GFP)* sont analysées par le cytomètre LSR FORTESSA (Becton Dickinson)..

IV.2 Sur les cellules de poissons adultes (6 mois)

IV.2.1 Dissection des poissons

Les poissons zèbres âgés de 6 mois sont euthanasiés dans une solution de Benzocaïne (2x 40µL à 100mg/ml dans 80mL d'H₂O) avant le prélèvement du sang, du rein et de la rate. Le sang est obtenu par ponction cardiaque avec une aiguille enduite d'héparine (50µg/mL) et est immédiatement étalé sur une lame de verre pour coloration May-Grunwald-Giemsa (MGG). Après une incision ventrale et médiane, le rein et la rate sont disséqués et placés séparément dans un tube contenant du *SM glacé* (0,9X DPBS sans Ca²⁺ ou Mg²⁺ + 5% Sérum de Veau Fœtal).

IV.2.2 Extraction de cellules à partir d'organes

L'organe est dilué avec du *SM glacé* (0,9X DPBS sans Ca²⁺ ou Mg²⁺ + 5% Sérum de Veau Fœtal) et la suspension cellulaire est passée à travers un filtre de 40µm au-dessus d'un tube falcon de 50 mL. Pour rincer les cellules à travers le filtre, le tube est rempli de *SM glacé* jusqu'à la marque de 25 mL et les cellules sont centrifugées pendant 5min à 300g 4°C. Le surnageant est retiré et la suspension cellulaire est reprise avec 2-3mL de *SM glacé* pour être de nouveau séparée à travers un filtre de 40µm et 5ml de *SM* sont ajoutés avant une nouvelle centrifugation pendant 5min à 300g 4°C. Le surnageant est retirée et les cellules sont reprises avec 500µL–1mL de *SM*. Du FVS700 (BD Horizon; 1/10000) a été ajouté pour exclure les cellules mortes et les débris lors du passage en cytométrie en flux. Les cellules hématopoïétiques sont analysées en fonction des paramètres FSC (Forward Scatter) et SSC (Side Scatter) qui sont proportionnels à la taille et à la complexité des cellules par le cytomètre LSR FORTESSA (Becton Dickinson) (233).

IV.2.3 Cytospin

Les cellules hématopoïétiques sont analysées en fonction des paramètres FSC et SSC qui sont proportionnels à la taille et à la complexité des cellules par le cytomètre FACSAria-III (Becton Dickinson) (233) et chaque population est isolée dans des tubes différents. Des préparations de cytopspin à partir de cette suspension sont réalisées, colorées au MGG et examinées sous microscope.

V. Western-Blot

V.1 Extraction des protéines

25 embryons sont déchorionnés avec de la pronase (1mg/mL). Le vitellus est ensuite retiré via des triturations avec une pipette en verre dans un milieu froid de PBS 1X. Les embryons sont ensuite placés pendant 30min, sur la glace, dans un tube contenant 300 μ L de tampon de lyse : Lysis Buffer 10X (Cell Signaling), Proteinase Inhibitor Cocktail 25X (Sigma Aldrich), Anti-phosphatase 10X (Cell Signaling) qsp H₂O. Après la lyse, les échantillons sont soumis aux ultrasons à une amplitude de 20% pendant 10s puis centrifugés 15min à 14000g. Le surnageant est récupéré et les protéines sont dosées à l'aide du kit DcAssay (BioRad, France). Les mesures d'absorbances sont réalisées à 690 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (MicrolekFli, France). Les protéines sont ensuite dénaturées 5min à 95°C dans du tampon Laemli (Tris 0.2M, glycérol 30 %, β -mercaptoéthanol 5 %, SDS 2 % et du bleu de bromophénol).

V.2 Western-Blot

Les gels d'acrylamide à 10% préalablement préparés ont été placés dans une cuve et ont été recouverts de tampon de migration (Tris base 25 mM, SDS 0,1 %, glycine 190 mM, pH 8,3–8,8). Les échantillons et un marqueur de poids moléculaire (Thermo Scientific) ont ensuite été déposés dans les puits. La migration dans le gel de concentration a été réalisée à 90V puis le voltage a été augmentée jusqu'à 110 V durant 1h30. Après la migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF (Millipore, France) dans un tampon de transfert borate (Tris base 50 mM, acide borique 50 mM). Le transfert est effectué pendant 1h30 à 47V dans la glace. La membrane a ensuite été saturée 1h en PBS-Tween20 0,1% avec 5% lait (Régilait). L'incubation des anticorps primaires (HSP70 (1/1000; ADI-SPA-812, EnzoLife), β -Actin (1/1000; SC-1616, SantaCruz) and HSF1 (1/1000; 4356, Cell Signaling)) a été réalisée sur la nuit à 4°C. Les anticorps secondaires spécifiques des espèces des anticorps primaire couplés à une peroxydase de raifort (Jackson ImmunoResearch Laboratories) ont été incubés 1h30 à température ambiante. Enfin, les membranes ont été lavées 3 fois 10min dans du PBSTween20 0,1% puis révélées par chimioluminescence à l'aide du substrat Crescendo HRP (Millipore). Le signal a été enregistré avec l'appareil Chemidoc XRS+ (BioRad) et l'analyse des images obtenues a été réalisée avec le logiciel Image Lab (BioRad).

VI. Analyse des cellules hématopoïétiques chez les embryons (2jpf)

VI.1 Coloration de l'hémoglobine à l'o-dianisidine

L'hémoglobine est une molécule considérée comme catalyseur de l'oxydation péroxydative de la molécule O-dianisidine produisant une coloration rouge foncé dans les cellules positives pour l'hémoglobine. La réaction de l'oxydation est proportionnelle à la quantité de l'hémoglobine. Les embryons sont euthanasiés dans une solution de Benzocaïne (80µL à 100mg/ml dans 80mL d'H₂O). Puis, ils sont récupérés et mis pendant 20min dans le noir à température ambiante, dans 200µl d'une solution d'O-dianisidine préparée fraîchement (8,68mL d'EtOH (40%), 1mL d'O-dianisidine (6 mg/ml dans de l'EtOH 100%), 0,1mL de sodium d'acétate (1M) et H₂O₂ (30%)). Ils sont ensuite lavés 3 fois avec du PBS pendant 5min et placés dans une solution de PFA 4% durant 1h à 4°C. Les embryons sont transférés dans une solution de glycérol 70% et observés sous une loupe (Leica MZ FLIII) et photographiés.

VI.2 Coloration des macrophages au rouge neutre

Entre 20 à 25 embryons sont anesthésiés dans une solution de Benzocaïne (40µL à 100mg/ml dans 80mL d'H₂O). Puis, ils sont récupérés et mis dans 5mL d'une solution au rouge neutre préparée au préalable (5µL d'une solution du rouge neutre à 0,5 % (FluKa, BioChemika) dans 5mL de milieu E3) pendant 2 heures à 28°C. Le rouge neutre est phagocyté par les macrophages qui prennent une couleur rose foncé. Les embryons sont ensuite lavés 3 fois avec du PBS pendant 5min et sont observés sous une loupe (Leica MZ FLIII) et photographiés.

VI.3 Morphologie des érythrocytes

Entre 10 à 15 embryons anesthésiés sont placés dans une petite boîte de Petri contenant une solution de PBS 1X et d'EDTA 1mM. La nageoire caudale est transsectionnée. Après avoir laissé les embryons saigner pendant 15 minutes, ils sont retirés. La solution contenant le sang est récupérée. Des préparations de cytopspin à partir de cette suspension sont réalisées, colorées au May-Grunwald Giemsa (MGG) et examinées sous microscope.

VI.4 Microscopie et imagerie

Toutes les expériences d'imagerie des poissons zèbres ont été réalisées sur la plateforme CellmaP à Dijon. Les images d'embryons ont été prises avec un Axio zoom V16 (Zeiss), composé

d'un microscope à zoom motorisé, d'une lampe fluorescente HPX 200 C couplée à une caméra CCD HRm Zeiss et à un ordinateur avec le logiciel d'acquisition et de traitement de l'image ZEN. Pour faciliter l'observation au microscope, les larves sont anesthésiées avec une solution de Benzocaïne (40µL à 100mg/ml dans 80mL d'H₂O).

VII. Synthèse et Injection d'ARN *HSF1*

VII.1 Amplification et purification du plasmide *HSF1*

Une transformation bactérienne par choc thermique est réalisée. 5µl du plasmide d'*HSF1* (pcDNA-h*HSF1* WT Addgene plasmid #71724; RRID: Addgene_71724) est ajouté à 50µl de bactéries compétentes TOP10 et les tubes sont incubés 45min sur glace. Les bactéries sont transformées par choc thermique pendant 45s à 42°C et de nouveau placées sur la glace pendant 2min. La suspension bactérienne est diluée dans 250µl de milieu SOC et mise à incuber sous agitation 1h à 37°C. Un volume de 100µl de la suspension est ensuite étalé sur des boîtes contenant du milieu Lysogeny Broth (LB) et l'antibiotique adapté (Ampicilline 100µg/mL).

Les colonies obtenues après transformation bactérienne sont isolées et mises en culture dans 5ml de milieu LB contenant 5µL de l'antibiotique de sélection (Ampicilline 100µg/mL) et les tubes sont incubés à 37°C sous agitation pendant une nuit. Le kit Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel) est utilisé conformément au protocole du fabricant pour purifier l'ADN plasmidique par mini préparation permettant l'obtention de l'ADN plasmidique débarrassé des endotoxines bactériennes.

A partir de la mini-préparation, un volume de 2ml estensemencé dans 200ml de milieu LB liquide + 20µL d'Ampicilline (100µg/mL) et le milieu est incubé à 37°C sous agitation pendant une nuit. Le kit NucleoBond Xtra Maxi (Macherey-Nagel) est utilisé conformément aux recommandations du fabricant pour réaliser des préparations. La concentration d'ADN plasmidique est mesurée avec un spectrophotomètre NanoDrop.

VII.2 Linéarisation et purification du plasmide

Le plasmide *HSF1* est linéarisé par l'enzyme de restriction *eglnII*. Le mélange réactionnel est constitué de la préparation plasmidique purifiée 2µg, du tampon 10X associé à l'enzyme de restriction 5µL, de l'enzyme de restriction 1µL, qsp 50µL d'H₂O ARNse et placé à incuber 2 heures à 37°C au bain-marie. La digestion est terminée après ajout de 5µL Sodium Acétate 3M

et de 150µL d'EtOH 100%. Le plasmide est purifié après passage à -80°C pendant un temps supérieur à 60min puis après une double centrifugation à 20000g 4°C pendant 15 et 20min avec lavage à l'EtOH 100% puis repris dans 10µL d'H₂O. L'efficacité de la linéarisation de du plasmide est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose. La concentration d'ADN plasmidique linéaire est mesurée avec un spectrophotomètre NanoDrop.

VII.3 Transcription de l'ARN HSF1

La transcription du gène *HSF1* *in vitro* est réalisée grâce au mMachine T7 Transcription Kit (Invitrogen). Le kit rajoute une coiffe de 7-méthylguanosine à l'extrémité 5' de l'ARN.

Ainsi, 1µg de plasmide linéarisé et purifié est utilisé dans chaque réaction de transcription. Le mix réactionnel comprend 10µL 2X NTP/CAP, 0,1 à 1µg d'ADN *HSF1* linéaire, du tampon 10X 2µL, de l'ARN T7 polymérase 2µL, qsp 20µL d'H₂O. Le mélange est incubé à 37°C pendant 2h. Après incubation, 1µL de DNase est ajouté au mélange et remis à incubation pendant 15min à 37°C.

Une queue Poly A est rajoutée à l'extrémité 3' de l'ARN avec le Poly A tailing kit (CELLSCRIPT). L'ARN transcrit *in vitro* est purifié en utilisant le kit Qiagen RNeasy conformément au protocole du fabricant et remis en suspension dans un volume final de 10µL. La concentration d'ARN est ensuite quantifiée en utilisant un spectrophotomètre Nanodrop.

VII.4 Injection d'ARN

La solution d'injection est constituée de l'ARN d'HSF1 préalablement préparé, de fluorescéine (marqueur vert fluorescent), qsp 10µL d'H₂O.

Les injections dans les œufs de poisson zèbre sont effectuées sous une loupe (LEICA MZ FLIII) via un capillaire en verre relié à un micro-injecteur (EPPENDORF FemtoJet) dans la première cellule de l'embryon (stade 1-cellule).

Après injection, les embryons sont placés dans une boîte de Petri contenant du milieu E3 avec du bleu de méthylène.

RÉSULTATS

I. Knock-out de *hsf1* via la méthode CRISPR/Cas9

Suite à notre analyse, l'algorithme CHOCHOP nous a proposé 10 séquences cibles de 23 paires de bases : 20 paires de bases pour la séquence cible et 3 paires de base pour le PAM.

Une tentative de knock-out du gène *hsf1* a été réalisée à partir des 4 premières cibles proposées par l'algorithme car elles possédaient le meilleur rapport %GC/score d'efficacité (**Annexe 1**) : ranking n°1 sur l'exon 13, n°2 sur l'exon 9, n°3 sur l'exon 9 et n°4 sur l'exon 4. Sur ces 4 premières cibles, seule la cible n°3 (exon 9) a pu être validée et sera donc développée dans ces résultats. L'exon 9 possède 234 paires de base (**Figure 14**).

```
AACGAGCCCATTGGTCCACATCAAAGAAGAGCCGTCTAGCCCCGCCACAGCCCTGAGGTGGAAGAGGTGTGCCTGTGGAAGTAGAAGTG  
GGGGCTGGGTCTGATTTGCCTGTGYGACACGCCCTTTCGCCACAACCTTCATAAACTCCATCCTTCAGGAGAGCGAGCCAGTCTCCGCC  
TGACTCCGCTCCAGCGAACAGAAGTGCTTGAGCGTCGCCTGCCTGGACAA
```

Figure 14 Structure de l'exon 9 *hsf1*

Légende : Surlignage gris = Exon 9, Surlignage jaune = séquence cible n°3 de l'exon 9, ^Y = site de coupure de la Cas9.

I.1 Obtention de la Génération F0

Le sgARN est constitué du crARN avec la séquence cible n°3, située sur l'exon 9 de *hsf1* et dépourvue du site PAM (-AGG-) situé en amont de la zone de coupure de la Cas9 sur la séquence cible, et du tracrARN.

Le sgARN a été co-injecté à différentes concentrations (200, 300 et 400ng/μL) avec la Cas9-NLS et la cassette oligonucléotide contenant les codons stop. La Cas9-NLS coupe au niveau de la 115^{ème} paire de base de l'exon 9.

L'obtention de la génération F0 s'est faite en 2 étapes et a été validée par PCR (**Figure 15–16**) :

- 1^{ère} amplification : avec le couple de primers dont le primer sens (F1 : CATTGGTCCACATCAAAGAAGA) est situé sur l'exon en amont de la cassette insérée et le primer anti-sens (R1 : atgcacacaggaagagaactca) est situé sur l'intron suivant l'exon 9.
- 2^{ème} amplification : avec le couple de primers dont le primer sens (F1 : CATTGGTCCACATCAAAGAAGA) est situé sur l'exon en amont de la cassette insérée et le primer anti-sens (R2 : CAACAGCTTAATTAAGGTTTAAACGCCATG) est situé sur la cassette insérée.

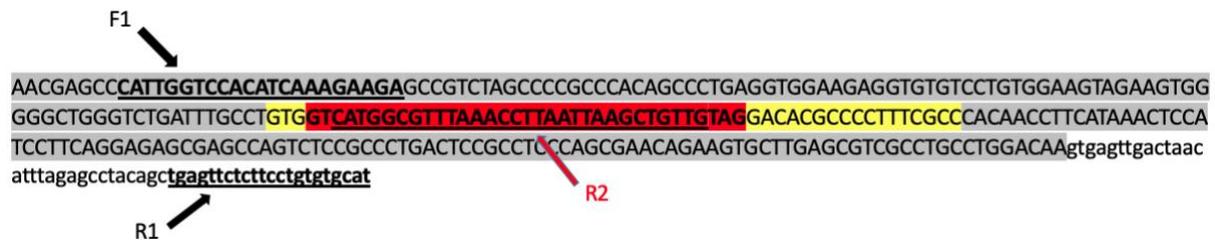


Figure 15 Structure Exon 9 *hsf1* avec les primers F1, R1 & R2

Légende : Surlignage gris = Exon 9, Surlignage jaune = séquence cible n°3 de l'exon 9, Surlignage rouge = cassette oligonucléotide insérée contenant les 3 codons stops, lettres minuscules = intron post-exon 9, F1 = primer sens situé sur l'exon 9 (CATTGGTCCACATCAAAGAAGA), R1 = primer anti-sens situé sur l'intron post-exon 9 (atgcacacaggaagagaactca), R2 = primer anti-sens situé sur la cassette insérée (CAACAGCTTAATTAAGGTTAAACGCCATG).

Lors de la 1^{ère} amplification, la taille de F1R1 attendue est de 278bp chez les embryons non injectés et de 313bp chez les embryons injectés en raison de la présence de la cassette de 35bp. Néanmoins, la différence de paires de base étant très faible, une 2^{ème} amplification était nécessaire avec le couple F1R2 pour mettre en évidence la présence de la cassette.

Dans les embryons non-injectés, la cassette étant absente, il ne peut y avoir de 2^{ème} amplification et on notera l'absence de 2^{ème} bande. A l'inverse, si la cassette s'est bien insérée suite à l'injection, on observera une 2^{ème} bande d'amplification de 137bp dans les embryons injectés (**Figure 16**).

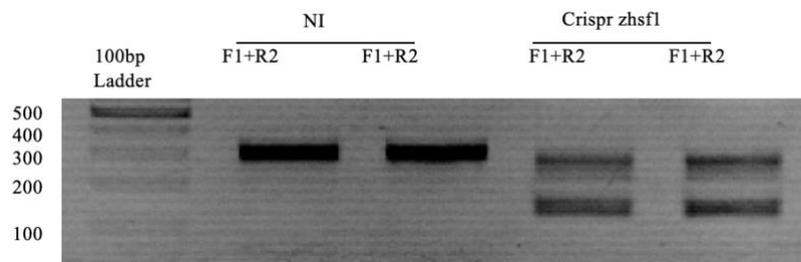


Figure 16 Photo du gel après une double amplification de l'ADNg avec les primers F1R1 & F1R2 chez les embryons non-injectés (NI) et injectés (crispr *hsf1*)

La cible n°3 est validée et permet l'obtention de la génération F0.

Dans un deuxième temps, après validation de l'insertion de la cassette et de la concentration cible de sgARN à 300ng/μL, une nouvelle injection est réalisée sur un nombre d'embryons plus important (1^{ère} injection = 100 embryons, 2^{ème} injection après validation = 500 embryons).

Suite à cette 2^{ème} injection, l'ADNg d'embryons âgés de 6 jpf a été amplifié par PCR pour connaître le pourcentage d'insertion de la cassette oligonucléotide contenant les codons stops. Sur 20 poissons zèbres testés, 11 larves avaient la cassette insérée indiquant une efficacité de 55%.

Le reste des embryons injectés positifs va grandir jusqu'à maturité sexuelle. En effet, la cassette est bien insérée mais on ne sait pas à ce stade, si l'insertion a eu lieu uniquement dans les cellules somatiques ou dans les cellules germinales et somatiques.

I.2 Obtention de la Génération F1

Au bout de 3 mois, chaque poisson zèbre injecté positif (F0) a été croisé (x) avec un poisson zèbre sauvage (WT) et comme précédemment, à 2 jpf, l'ADNg d'embryons issus du croisement a été fixé et a subi une amplification avec le couple F1R1 dont le primer R1 est situé sur l'insert. Si on observe une bande d'amplification alors le poisson zèbre injecté positif F0 possédait bien la cassette dans ses cellules germinales. Néanmoins, cette génération F0 est mosaïque.

A partir de 6 jpf, l'ADN des embryons du croisement entre F0 et WT va subir des amplifications par PCR avec différents couples de primers pour identifier la génération F1.

Les primers F1, R1 et R2 sont toujours utilisés, ainsi que 2 nouveaux primers : un primer sens F2 (CATGGCGTTTAAACCTTAATTAAGCTGTTG) situé sur la cassette insérée et un primer anti-sens R3 (cagtgccctaagaaagccagtta) situé sur l'intron post exon 9 après le primer R1 (**Figure 17**).

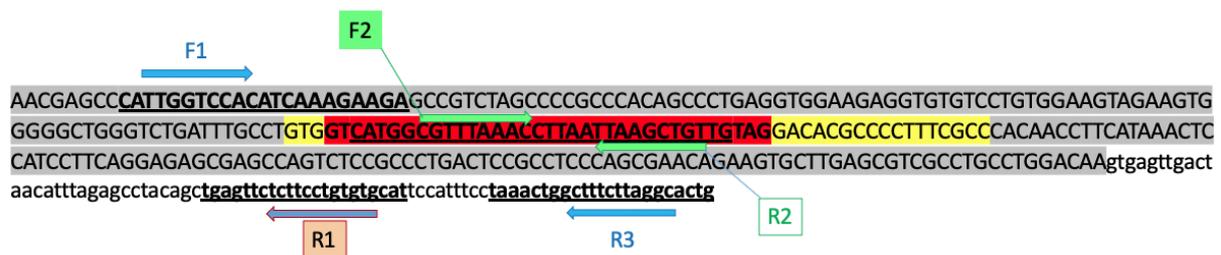


Figure 17 Structure Exon 9 *hsf1* avec les primers F1, F2, R1, R2 & R3

Légende : F2 = primer sens situé sur la cassette insérée (CATGGCGTTTAAACCTTAATTAAGCTGTTG), R3 = primer anti-sens situé sur l'intron post-exon 9 après R1 (cagtgccctaagaaagccagtta).

Pour chaque ADNg, trois amplifications séparées ont été réalisées (**Figure 18**):

- Primers F1R2 : bande d'amplification attendue à 139bp si présence de la cassette
- Primers F2R3 : bande d'amplification attendue à 236bp si présence de la cassette
- Primers F2R1 : bande d'amplification attendue à 204bp si présence de la cassette

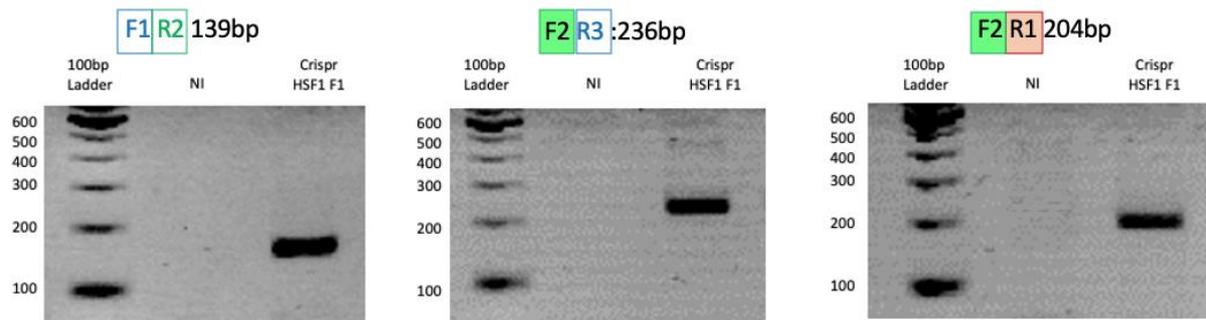


Figure 18 Photo de gels obtenus chez un poisson zèbre F1(crispr *hsf1* F1) après amplification de l'ADNg avec les couples de primers F1R1, F2R3 & F2R2 par rapport à un poisson WT

Chaque poisson zèbre issu du croisement de F0 × WT validé séparément par les 3 amplifications est isolé dans l'animalerie et il est nommé Génération F1 hétérozygote.

L'ensemble des poissons validés a grandi jusqu'à maturité sexuelle.

I.3 Obtention de la Génération F2

Au bout de 3 mois, la génération F1 hétérozygote a atteint sa maturité sexuelle. Un croisement a été réalisé entre un F1 mâle et un F1 femelle pour obtenir un poisson zèbre F2 homozygote pour le knock-out du gène *hsf1*. Selon la loi de Mendel, suite à ce croisement, 25% des embryons issus de ce croisement seront normalement homozygotes pour le knock-out du gène *hsf1*.

Comme pour l'identification de la génération F1, l'ADNg de ces poissons a subi une amplification par PCR avec un seul couple de primers F1R1.

Chaque produit de PCR a été déposé dans un puits du gel d'agarose à 2% et une migration a été réalisée à 70V. En effet, la taille de la bande d'amplification du couple F1R1 est de 277bp si l'insert n'est pas présent et de 313bp si l'insert est présent. Dans la génération F1, on devait donc observer la présence des 2 bandes car la génération F1 est hétérozygote, au contraire de la génération F2, qui est homozygote et où une seule bande devait être visible, celle à 313bp (Figure 19).

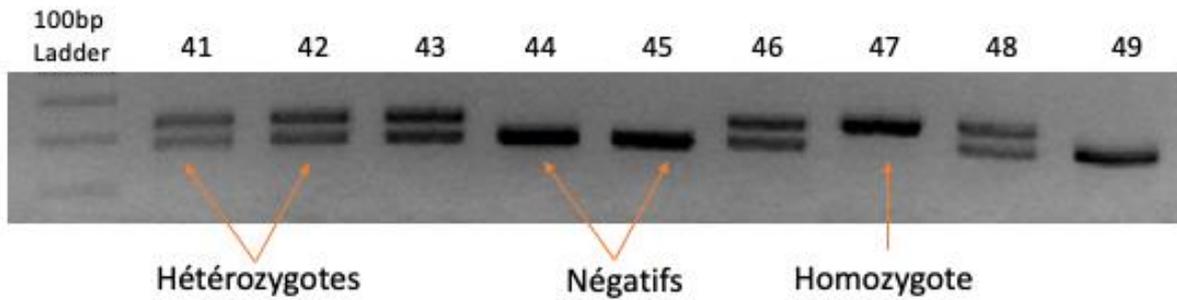


Figure 19 Photo de gel obtenu après amplification de F1R1 par PCR chez 8 poissons zèbres (n°33 à 40) issus du croisement de F1 × F1.

Au total, les ADN des 4 poissons zèbres (n°5, n°38, n°39, n°47) ont présenté le même profil après migration sur gel d'agarose.

L'ADNg de ces 4 poissons zèbres a été envoyé à séquencer chez GENEWIZ en ciblant l'exon 9 du gène *hsf1*. Le même couple de primers F1R1 utilisé pour les PCR a été synthétisé. Le séquençage a confirmé la présence de la cassette oligonucléotide contenant les trois codons stops sur les deux brins complémentaires pour chacun des 4 poissons zèbres testés (**Figure 20**).

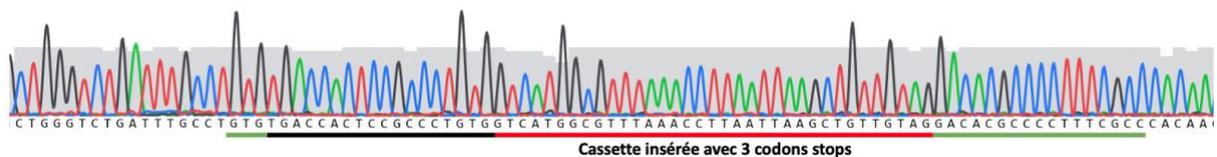


Figure 20 Résultat du séquençage d'une partie de l'exon9 de *hsf1* après insertion d'une cassette par CRISPR/Cas9

Légende : Trait rouge = cassette insérée avec les 3 codons stops, trait noir = paires de bases insérées après recombinaison, trait vert = séquence cible n°3 (GGCGAAAGGGGCGTGTCΨCAC ou brin complémentaire GTGΨGACACGCCCTTTCGCC avec Ψ = site de coupure de la Cas9)

Après 16 mois, nous avons donc validé notre génération F2 homozygote pour le knock-out du gène *hsf1* avec sur les 4 poissons zèbres obtenus : 2 mâles et 2 femelles.

II. Effet du knock-out de *hsf1* sur le développement du poisson zèbre

Après obtention de notre modèle, nous avons, tout d'abord, observé l'impact du knock-out du gène *hsf1* (*hsf1*^{-/-}) sur le développement du poisson zèbre.

Dans un premier temps, nous avons validé que nos 2 femelles *hsf1*^{-/-} étaient fertiles contrairement aux souris femelles *hsf1*^{-/-} qui sont stériles (155).

Dans un deuxième temps, une étude de la survie a été réalisée pendant les 15 premiers jours (J) de développement des poissons zèbres en l'absence de tout choc thermique. Néanmoins, seuls les résultats des six premiers jours ont été analysés (Figure 21A).

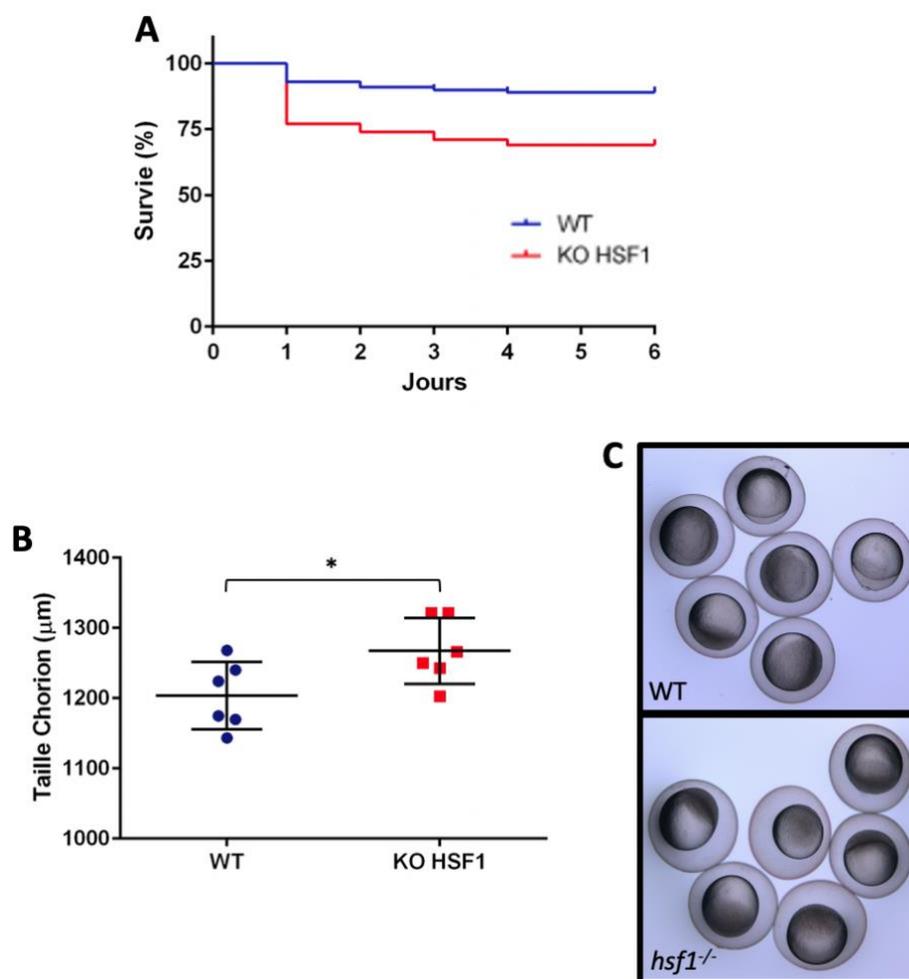


Figure 21 Les embryons KO HSF1 survivent moins bien que les embryons WT de 0 à 6jpf mais présentent un chorion à 0hpf plus important

Légende : (A) Courbe de survie estimée avec la méthode de Kaplan-Meier pour les poissons zèbres WT (n=100) comparés aux poissons zèbres KO *hsf1* (n=100). Le test de logrank a été utilisé pour comparer les deux lignées (***) p=0,0005, significatif). (B) Mesures en µm de la taille du chorion à 0hpf chez les embryons WT (n=6) et les embryons KO *hsf1* (n=6) (t-TEST ; * p<0,04117). (C) Images du chorion d'embryons de poissons zèbres WT et *hsf1*^{-/-} âgés de 48hpf prises avec un microscope Axiozoom.

Après 24 heures post-fécondation (J1), on observe une survie significativement diminuée (n=100 en triplica biologique) chez nos embryons KO *hsf1* (77%) par rapport à nos embryons WT (93%). De J2 à J6, une décroissance linéaire est observée aussi bien chez nos embryons WT que chez nos embryons KO HSF1 avec à J6, une survie respectivement de 69% et de 89%. Nous avons également remarqué que les chorions des embryons KO *hsf1* (n=6) avaient tendance à avoir une taille plus importante que ceux des embryons WT (n=6) avec 1267,4 μ m contre 1203,5 μ m soit une augmentation de 5,3% (Figure 21B et C).

Le rôle du gène *hsf1* dans le développement de l'œil du poisson zèbre a préalablement été montré *via* l'utilisation d'un morpholino (225). Nous avons vérifié si ce résultat était retrouvé dans nos modèles KO pour le gène *hsf1* (Figure 22).

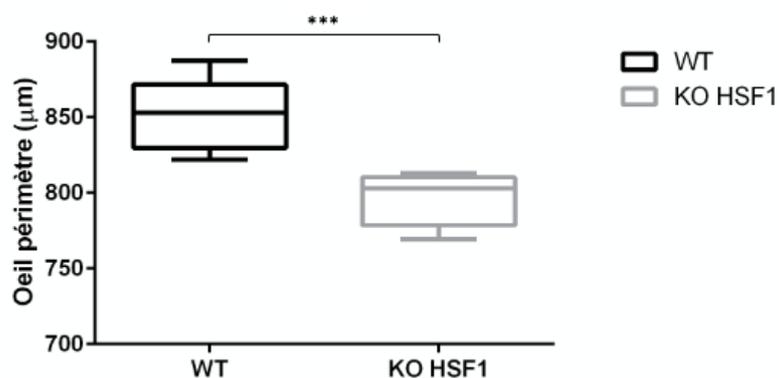


Figure 22 Présence d'une microphthalmie chez les embryons KO *hsf1* par rapport aux embryons WT à 48hpf

Légende : Mesures en μ m de la circonférence de l'œil à 48hpf chez les embryons WT (n=10) et les embryons KO *hsf1* (n=10) ; dans les boxplots, les cases délimitent le 1er quartile et 3^{ème} quartile, les lignes horizontales centrales désignent les médianes, les moustaches représentent les limites supérieure et inférieure (ANOVA ; *** p<0,0003)

À 48hpf, la circonférence de l'œil des embryons WT (n=10) est en moyenne de 851,76 μ m contre 796,98 μ m pour les embryons KO *hsf1* (n=10) soit une diminution de 6,43% (Figure 22). On observe donc une microphthalmie chez nos embryons *hsf1*^{-/-} caractérisée par une diminution de la circonférence de l'œil par rapport aux embryons WT. Cette différence au niveau de la taille des yeux est observable entre les embryons *hsf1*^{-/-} et WT (Figure 23A).

Nous avons également mesuré la longueur du corps (**Figure 23B**) sans observer de différence significative. En effet, la longueur du corps était chez les embryons WT (n=10) de 435,26 μ m contre 436,01 μ m chez les embryons *hsf1*^{-/-} (n=10).

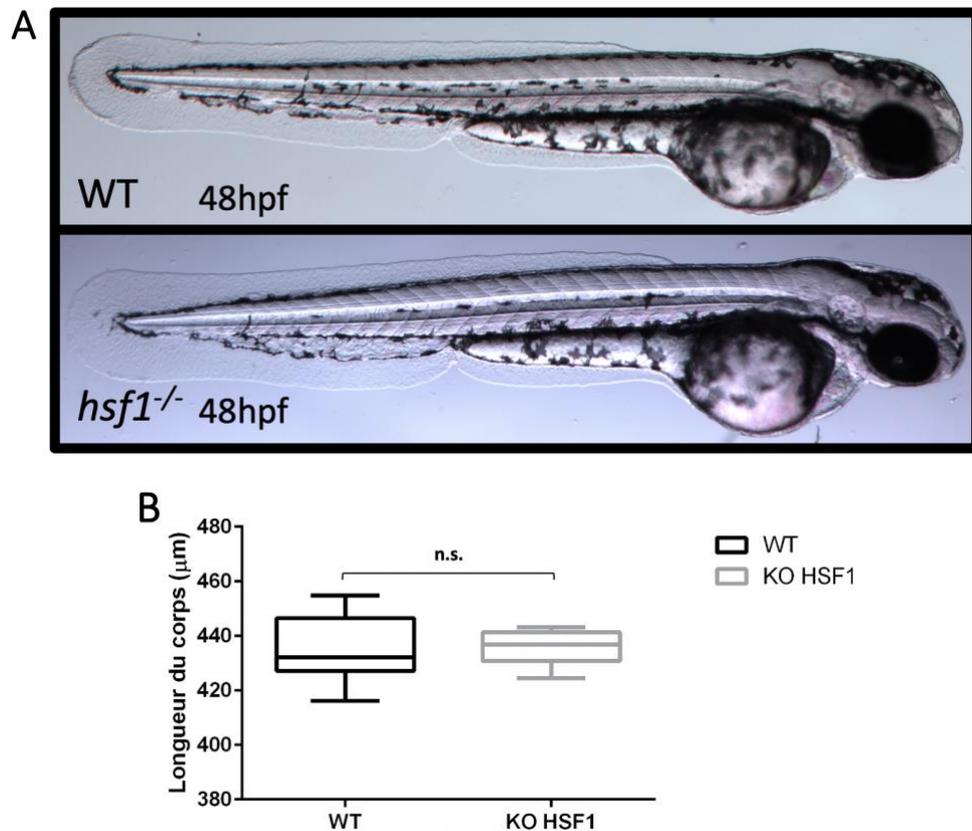


Figure 23 Absence de différence dans la longueur du corps entre les embryons WT et *hsf1*^{-/-} à 48hpf

Légende : (A) Embryons de poissons zèbres WT et KO HSF1 âgés de 48hpf. (B) Mesures en μ m de la longueur du corps à 48hpf chez les embryons WT (n=10) et les embryons KO *hsf1* (n=10) ; dans les boxplots, les cases délimitent le 1er quartile et 3^{ème} quartile, les lignes horizontales centrales désignent les médianes, les moustaches représentent les limites supérieure et inférieure (ANOVA ; n.s. $p > 0,05$).

III. Validation du modèle knock-out de *hsf1*

Après avoir observé l'impact du gène *hsf1* sur le développement du poisson zèbre, nous avons vérifié l'efficacité du KO du gène *hsf1* dans notre modèle.

Des pontes ont été réalisées à partir d'un couple F2 identifié KO pour le gène *hsf1* et les embryons obtenus ont subi un choc thermique à 37°C pendant 1h et l'expression du gène *hsp70* a été analysée par RT-qPCR (Figure 24).

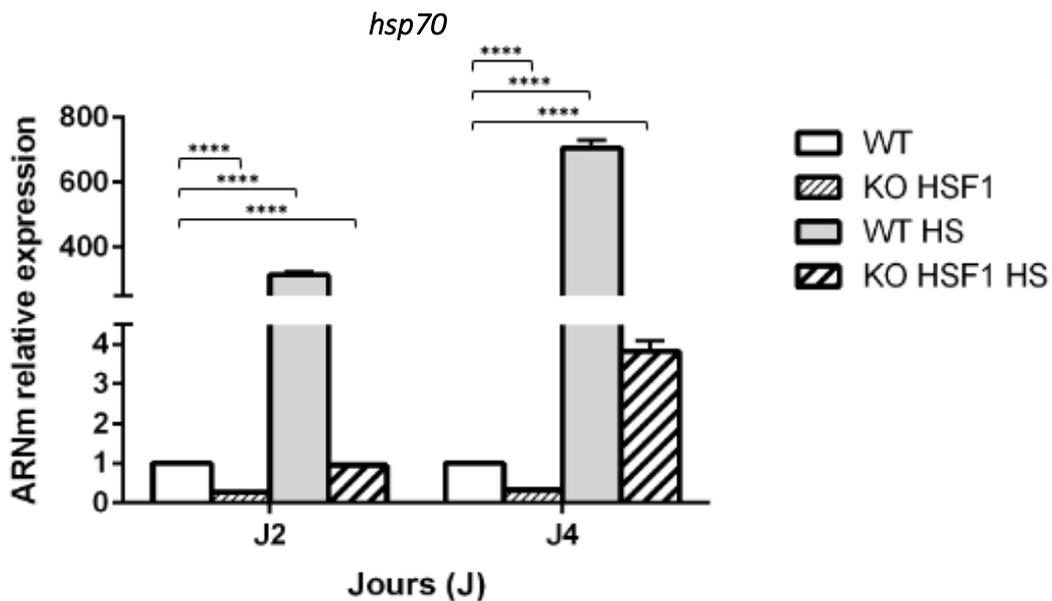


Figure 24 Résultat de RT-qPCR du gène *hsp70* à 48hpf (J2) et 96hpf (J4) des poissons zèbres knock-out pour le gène *hsf1* par rapport aux embryons WT

Légende : WT : Poisson zèbre témoin, KO HSF1 : poisson zèbre KO pour le gène *hsf1*, HS : Choc thermique à 37°C pendant 1h (two-way ANOVA ; **** P<0,0001 n=3)

On observe qu'en condition normale, l'expression du gène *hsp70* est fortement diminuée dans nos embryons KO *hsf1* par rapport à nos embryons témoins à 48 hpf (1 vs 0,27) et cette diminution persiste à 96 hpf (1 vs 0,33).

En condition de choc thermique, *hsf1* doit se fixer sur le HSE du gène *hsp70* entraînant la transcription du gène *hsp70* et donc la synthèse d'Hsp70. On observe que l'expression du gène *hsp70* est très augmentée suite au choc thermique chez nos embryons témoins à 48 hpf (augmentation d'un facteur 300) et à 96 hpf (augmentation d'un facteur 700).

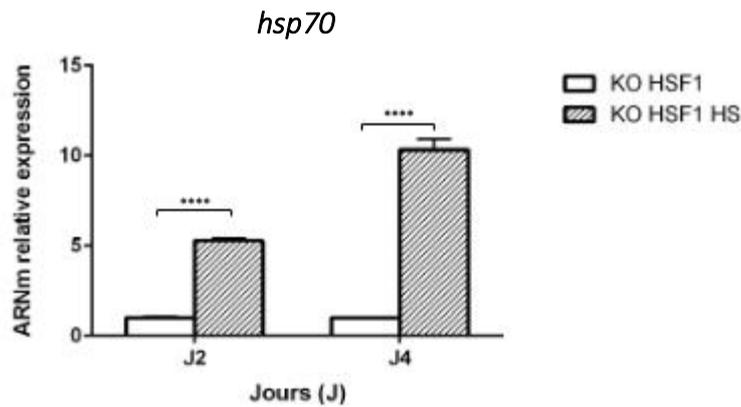


Figure 25 Résultat de RT-qPCR du gène *hsp70* à 48hpf (J2) et 96hpf (J4) des poissons zèbres KO *hsf1* par rapport aux embryons KO *hsf1* ayant subi un choc thermique
 Légende : KO HSF1 : poisson zèbre KO pour le gène *hsf1*, HS : Choc thermique à 37°C pendant 1h00 (two-way ANOVA ; **** P<0,0001, n=3)

En revanche, chez nos embryons KO *hsf1*, la stimulation de la transcription du gène *hsp70* est très faible suite au choc thermique par rapport à la stimulation de la transcription du gène *hsp70* chez les embryons WT. Ces résultats sont confirmés lorsque l'on compare uniquement l'expression du gène *hsp70* dans les embryons KO *hsf1* par rapport aux embryons KO *hsf1* en condition de choc thermique (Figure 25).

En effet, en condition de stress, l'expression du gène *hsp70* n'augmente que d'un facteur 5 à 48hpf et d'un facteur 10 à 96hpf entre nos embryons KO *hsf1* et nos embryons KO *hsf1* ayant subi un choc thermique.

Nous avons également évalué l'expression de la protéine Hsp70 en condition ou non de choc thermique dans nos embryons KO *hsf1* par Western-Blot (Figure 26).

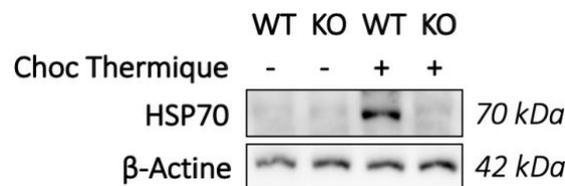


Figure 26 Évaluation de l'impact du KO *hsf1* sur l'expression de la protéine Hsp70
 Légende : WT : Poisson zèbre témoin, KO HSF1 : poisson zèbre KO pour le gène *hsf1*. Le choc thermique est réalisé à 37°C pendant 1h00.

En condition de choc thermique, nous avons observé l'expression de la protéine Hsp70 dans nos embryons WT et *hsf1*^{-/-}. En absence de choc thermique, la protéine Hsp70 n'est pas

exprimée dans les embryons WT et *hsf1*^{-/-}. A l'inverse, en condition de stress, la protéine Hsp70 est fortement exprimée dans nos embryons WT ayant subi un choc thermique tandis qu'aucune bande n'est visible pour les embryons *hsf1*^{-/-}.

Cette très faible expression du gène *hsp70* dans nos embryons *hsf1*^{-/-} et l'absence d'expression de la protéine Hsp70 en condition de choc thermique, témoignent de l'efficacité de notre knock-out par l'absence d'activation de la transcription du gène *hsp70* par Hsf1 malgré sa fixation sur l'HSE d'*hsp70* (234).

IV. Effet du knock-out de *hsf1* sur l'érythropoïèse

IV.1 Effet du knock-out de *hsf1* sur l'érythropoïèse primitive

IV.1.1 *gata1*

Une analyse globale de l'expression des gènes de différents facteurs érythropoïétiques des embryons âgés de 48hpf et de 96hpf a été effectuée par RT-qPCR pour observer l'impact de Hsf1 sur la voie érythroïde.

Parmi les facteurs érythropoïétiques, nous avons particulièrement étudié *gata1* marqueur de l'érythropoïèse (Figure 27).

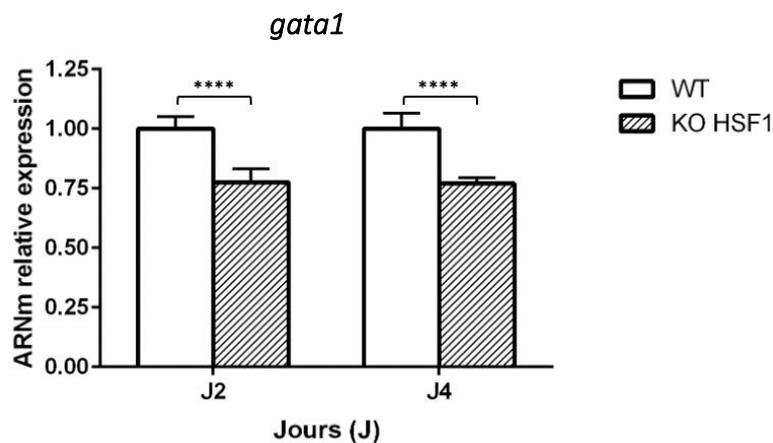


Figure 27 Résultat de RT-qPCR du gène *gata1* à 48hpf et 96hpf des poissons zèbres knock-out pour le gène *hsf1* par rapport aux embryons témoins

Légende : WT : Poisson zèbre témoin, KO HSF1 : poisson zèbre KO pour le gène *hsf1* (two-way ANOVA ; **** $P < 0,0001$, $n=3$)

Le knock-out de *hsf1* semble avoir un impact sur l'expression de *gata1*. En effet, l'expression de ce facteur dans les embryons KO *hsf1* diminue de façon significative de 22% à 48hpf et de 23% à 96hpf par rapport aux embryons WT.

Des croisements ont été réalisés entre notre modèle KO *hsf1* F2 et une lignée transgénique *Tg(gata1:DsRed)* dont l'ensemble des cellules exprimant le gène *gata1* vont fluorescer en rouge. Cette nouvelle lignée transgénique *Tg(hsf1^{-/-}/gata1:DsRed)* a été observée sous le microscope à fluorescence. Les images montrent qu'il y a moins de cellules *gata1:DsRed* au niveau de la tête et plus particulièrement au niveau du cœur chez les poissons zèbres *Tg(hsf1^{-/-}/gata1:DsRed)* mais également dans la circulation au niveau des vaisseaux inter-segmentaux par rapport aux embryons *Tg(gata1:DsRed)* à 48hpf et à 96hpf (**Figure 28**).

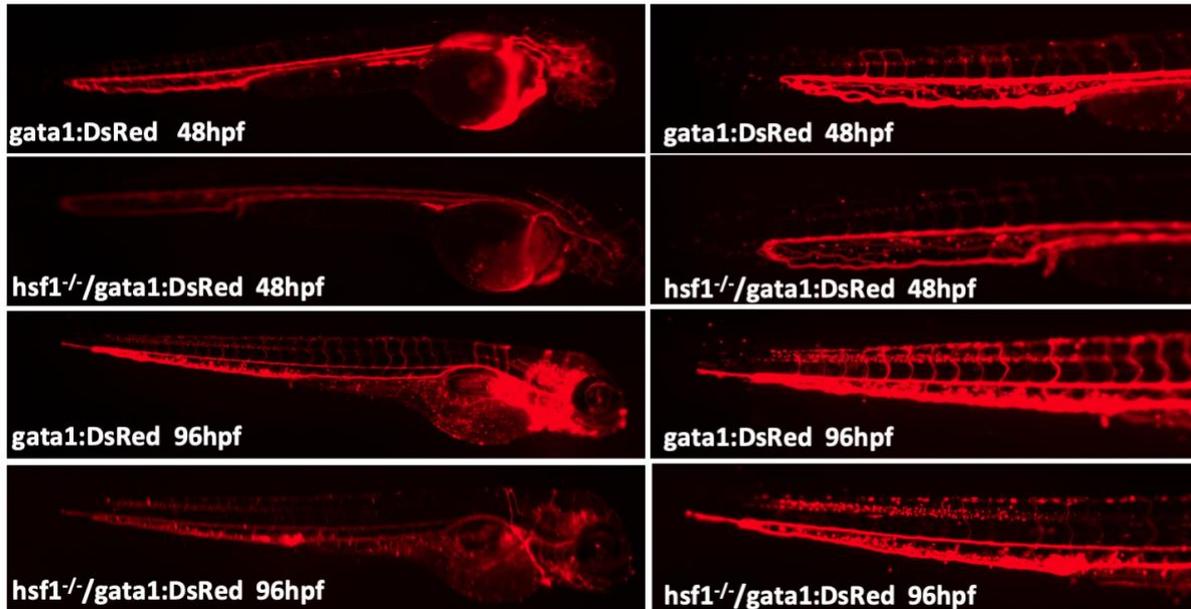


Figure 28 Image des cellules *gata1:DsRed* au niveau du corps et de la queue chez les poissons zèbres *Tg(gata1:DsRed)* et *Tg(hsf1^{-/-}/gata1:DsRed)* à 48hpf et 96hpf

Pour confirmer ces observations, la quantification de ces cellules *gata1:DsRed* à 48 hpf a été réalisée par cytométrie en flux. Les résultats montrent que le pourcentage de ces cellules *gata1:dsRed* chez les embryons *Tg(hsf1^{-/-}/gata1:DsRed)* est de 2.13% par rapport à 2,21% dans les embryons *Tg(gata1:DsRed)* (**Figure 29**). Le pourcentage de cellule *gata1+* est semblable entre nos 2 lignées. Néanmoins, l'intensité moyenne de fluorescence (MFI – mean fluorescence intensity) est fortement diminuée dans les embryons *Tg(hsf1^{-/-}/gata1:DsRed)* par rapport aux embryons *Tg(gata1:DsRed)* : 15600 vs 61530, n=1. Cette diminution de la MFI dans les embryons montre que la protéine Gata1 dans les embryons *Tg(hsf1^{-/-}/gata1:DsRed)* est plus faiblement exprimée.

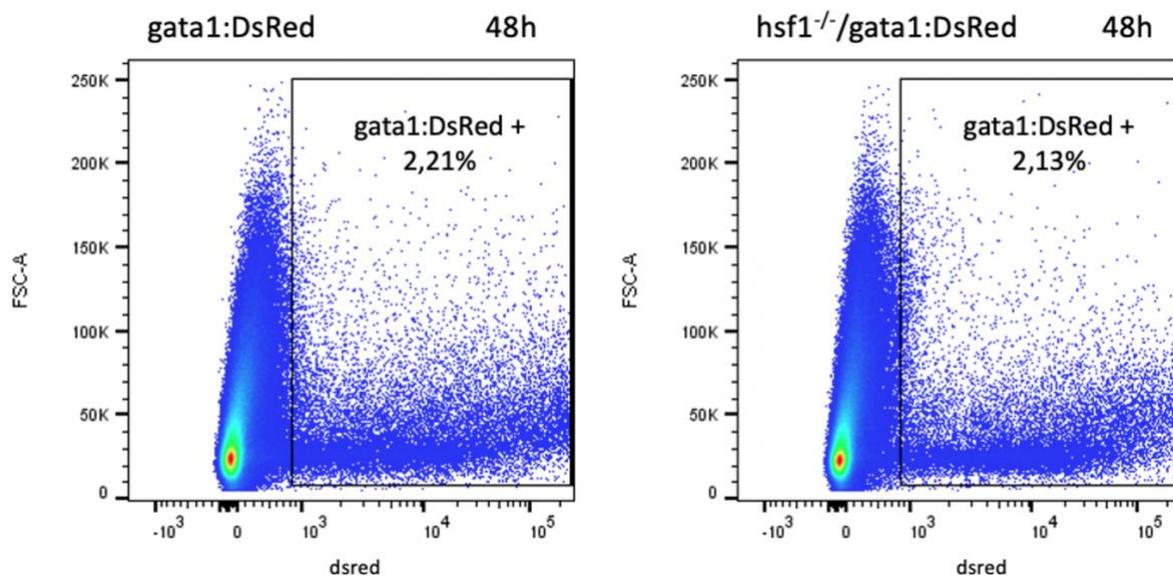


Figure 29 Analyse par cytométrie en flux du nombre cellules *gata1:DsRed* à 48hpf chez les embryons *Tg(hsf1^{-/-}/gata1:DsRed)* par rapport aux embryons *Tg(gata1:DsRed)*

Légende : (n=3 avec 45 poissons zèbres par condition). Les résultats sont traités avec le logiciel FlowJo et l'intensité moyenne de fluorescence (MFI – mean fluorescence intensity) affichée est celle d'une expérience (n=1) car l'intensité de fluorescence est sensible aux conditions expérimentales.

Ces résultats montrent que la réduction de l'expression de *gata1* suite au KO de *hsf-1* pourrait avoir un impact sur le nombre d'érythrocytes.

IV.1.2 Expression des gènes de globines *hbae1* et *hbbe1*

Pour confirmer les premiers résultats observés sur le gène *gata1*, l'expression des gènes embryonnaires de l'hémoglobine chez le poisson zèbre *hbae1* (chaîne α de la globine) et *hbbe1* (chaîne β de la globine) a été observée par RT-qPCR (Figure 30).

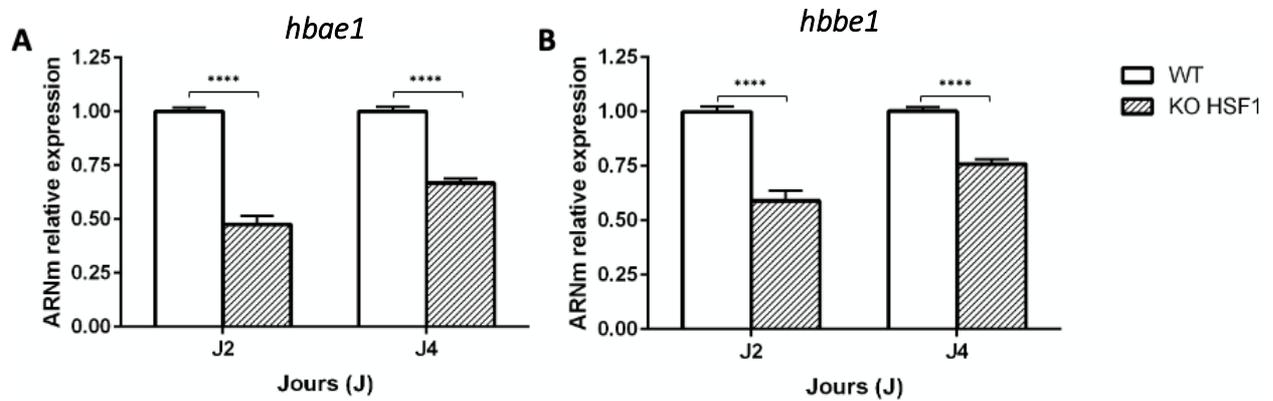


Figure 30 Résultat de RT-qPCR du gène *hbae1* (A) et *hbbe1* (B) à 48hpf et 96hpf des poissons zèbres knock-out pour le gène *hsf1*

Légende : WT : Poisson zèbre témoin, KO HSF1 : poisson zèbre KO pour le gène *hsf1* (two-way ANOVA ; **** P<0,0001, n=3)

Une diminution a été observée dans l'expression du gène *hbae1* de 52% et du gène *hbbe1* de 41% à 48 hpf chez les embryons KO *hsf1* par rapport aux embryons WT.

Cette diminution de l'expression des gènes embryonnaires de l'hémoglobine persiste à 96 hpf chez les embryons KO *hsf1* par rapport aux embryons WT avec une expression du gène *hbae1* de 34% et du gène *hbbe1* de 24%.

Une coloration de l'hémoglobine à l'o-dianisidine a également été réalisée pour confirmer les résultats de RT-qPCR. L'hémoglobine va catalyser l'oxydation de la o-dianisidine médiée par H₂O₂, produisant une tache rouge foncé dans les cellules positives à l'hémoglobine. Cette coloration indique qu'il y a peu d'hémoglobine dans les érythrocytes en circulation dans les embryons KO *hsf1* à 48hpf (**Figure 31**).

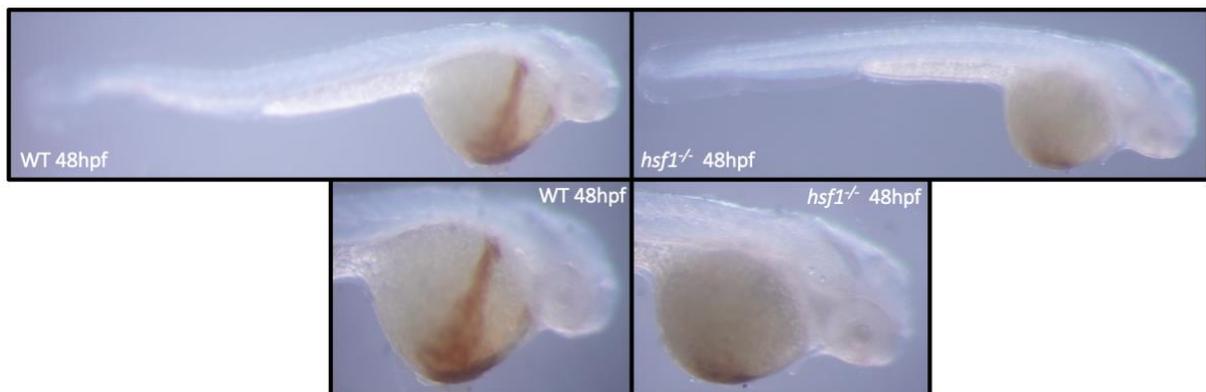


Figure 31 Coloration de l'hémoglobine à l'o-dianisidine à 48hpf chez des poissons zèbres témoins et KO *hsf1*

Cette diminution de l'hémoglobine dans les embryons KO *hsf1* persiste à 96 hpf par rapport aux embryons WT (**Figure 32**).

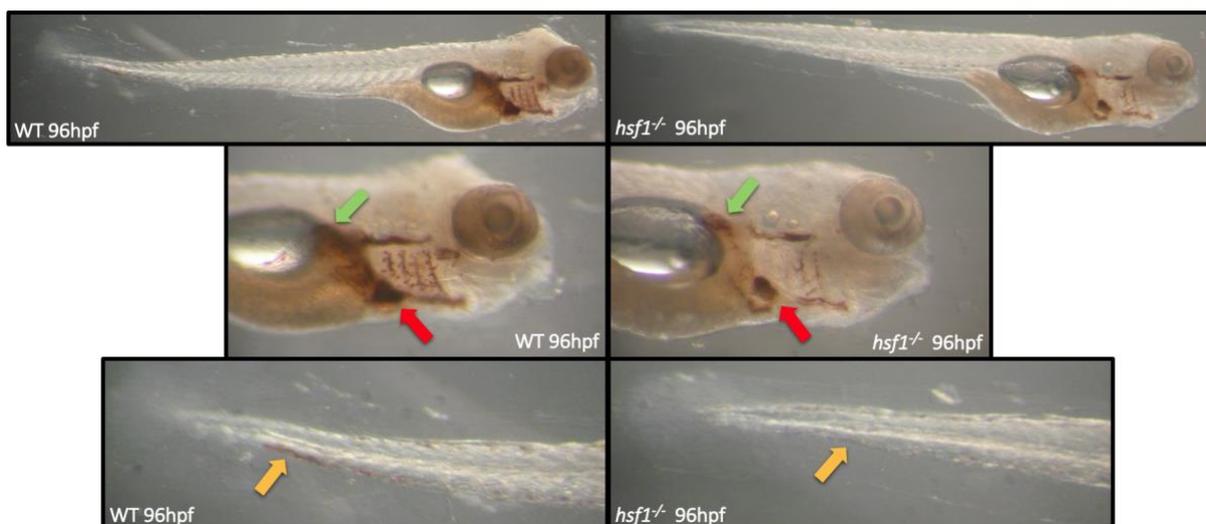


Figure 32 Coloration de l'hémoglobine à l'o-dianisidine à 96 hpf chez des poissons zèbres témoins et KO *hsf1*

Légende : Flèche rouge = Cœur, Flèche verte = Rein, Flèche Jaune = Tissu Hématopoïétique Caudal

Des nouveaux croisements ont été réalisés entre notre modèle KO *hsf1* F2 et une lignée transgénique *Tg(globine:GFP)* qui a la particularité d'avoir des globules rouges fluoresçant en vert. Cette nouvelle lignée transgénique *Tg(hsf1^{-/-}/globine:GFP)* a été observée sous le microscope à fluorescence. Les images montrent qu'il y a moins de cellules en circulation dans l'ensemble du corps des poissons zèbres *Tg(hsf1^{-/-}/globine:GFP)* par rapport aux embryons *Tg(globine:GFP)* (**Figure 33**) notamment au niveau des principaux organes hématopoïétiques.

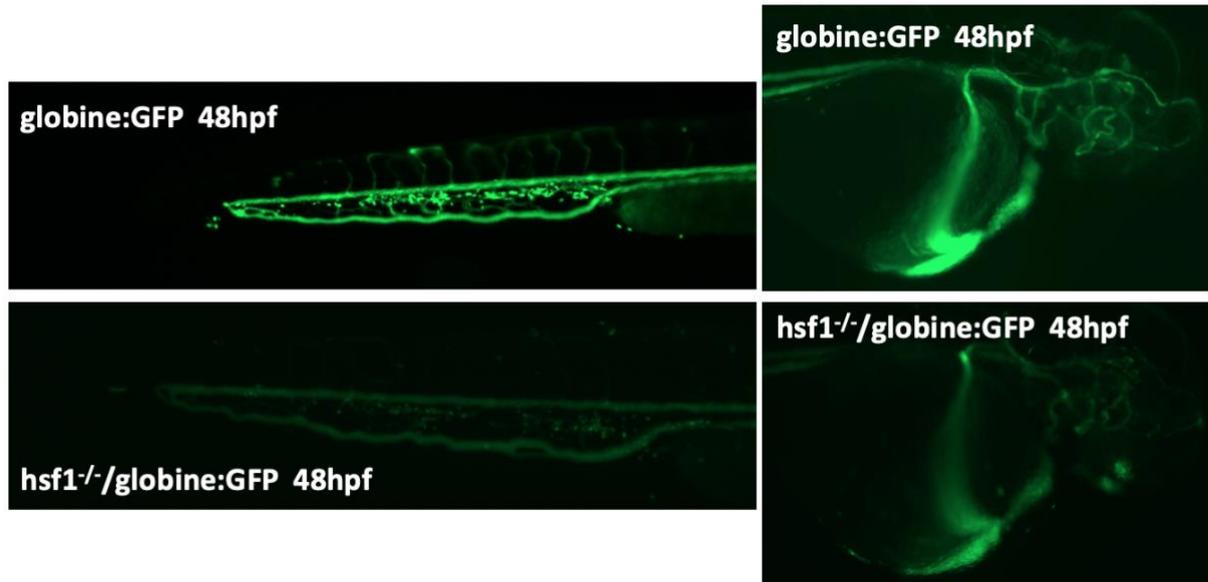


Figure 33 Image des cellules *globine:GFP* au niveau de la queue et de la tête/cœur chez les poissons zèbres *Tg(globine:GFP)* et *Tg(hsf1^{-/-}/globine:GFP)* à 48hpf

Pour confirmer les résultats de RT-qPCR et de coloration à l'*o*-dianisidine, la quantification de ces cellules *globine:GFP* à 48 hpf a été réalisée par cytométrie en flux. Les résultats montrent que le pourcentage de ces cellules *globine:GFP* chez les embryons *Tg(hsf1^{-/-}/globine:GFP)* est de 0,22% par rapport à 0,61% dans les embryons *Tg(globine:GFP)* soit une diminution de 64% (**Figure 34**). De plus, l'intensité moyenne de fluorescence (MFI – mean fluorescence intensity) est fortement diminuée dans les embryons *Tg(hsf1^{-/-}/ globine:GFP)* par rapport aux embryons *Tg(globine:GFP)* : 15930 vs 72632, n=1. Cette diminution de la MFI dans les embryons montre que la protéine Globine dans les embryons *Tg(hsf1^{-/-}/globine:GFP)* est également plus faiblement exprimée.

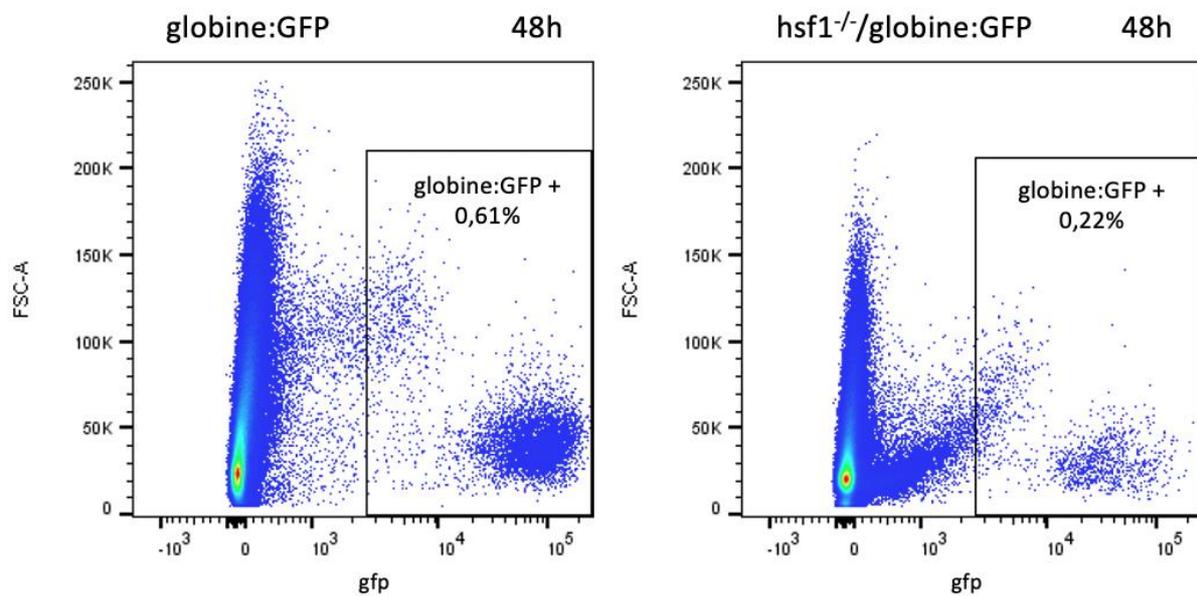


Figure 34 Analyse par cytométrie en flux du nombre de cellules *globine:GFP* à 48hpf chez les embryons *Tg(hsf1^{-/-}/globine:GFP)* par rapport aux embryons *Tg(globine:GFP)*

Légende : (n=3 avec 30 poissons zèbres par condition). Les résultats sont traités avec le logiciel FlowJo et l'intensité moyenne de fluorescence (MFI – mean fluorescence intensity) affichée est celle d'une expérience (n=1) car l'intensité de fluorescence est sensible aux conditions expérimentales.

IV.2 Effet du knock-out de *hsf1* sur la maturation des érythrocytes

On a vu précédemment qu'une invalidation définitive du facteur de transcription *hsf1* induit une diminution du nombre d'érythrocytes chez nos embryons KO *hsf1*. Suite à ces résultats, nous avons voulu vérifier si la différence de maturation des érythrocytes était présente entre nos embryons témoins et nos embryons KO *hsf1* (Figure 35).

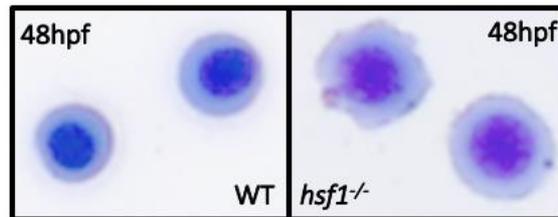


Figure 35 Comparaison de la morphologie des érythrocytes à 48hpf entre les poissons zèbres témoins (WT) et KO *hsf1* (*hsf1*^{-/-}) par coloration May-Grunwald Giemsa (Grossissement 100X)

Après isolation des érythrocytes et coloration MGG, une morphologie différente entre nos deux échantillons a été notée. À 48hpf, les érythrocytes des embryons témoins étaient au stade érythroblaste polychromatophile tandis que les érythrocytes des embryons KO *hsf1* étaient au stade érythroblaste basophile, stade qui dure normalement jusqu'à 30 hpf et qui précède le stade érythroblaste polychromatophile. On observe donc un retard de la maturation des érythrocytes dans les embryons KO *hsf1*.

A la lecture de ces résultats, le knock-out du gène hsf1 chez le poisson zèbre semble avoir un impact sur l'érythropoïèse primitive et la maturation des érythrocytes du poisson zèbre.

V. Restauration de l'activité d'Hsf1 dans le knock-out de *hsf1* par injection de l'ARNm humain d'*HSF1*

Afin d'essayer de réaliser le sauvetage (rescue) du phénotype observé, nous avons injecté l'ARNm d'*HSF1* humain dans des embryons de poissons zèbres WT et *hsf1*^{-/-} au stade-1 cellule.

Dans un premier temps, nous avons validé l'expression de la protéine humaine chez le poisson-zèbre par Western blot (**Figure 36**). Nous avons observé que l'expression de la protéine Hsf1 était plus élevée dans les embryons WT et KO *hsf1* injectés avec l'ARNm d'*HSF1* que dans les embryons WT et KO non injectés traduisant une traduction de la protéine humaine.

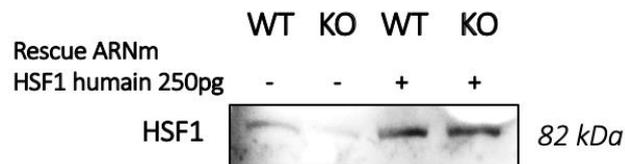


Figure 36 Confirmation de la traduction de l'ARNm d'*HSF1* humain en protéine dans les poissons zèbres KO *hsf1*

Légende : WT : Poisson zèbre témoin, KO : poisson zèbre KO pour le gène *hsf1*

Dans un deuxième temps, pour observer l'impact de ce sauvetage sur le modèle KO *hsf1*, nous avons analysé l'expression des gènes *gata1*, *hbae1* et *hbbe1* à 48 hpf par RT-qPCR. Pour ces 3 gènes, nous observons un sauvetage de l'expression des gènes érythropoïétiques chez les poissons zèbres *hsf1*^{-/-} (**Figures 37A, B, C**).

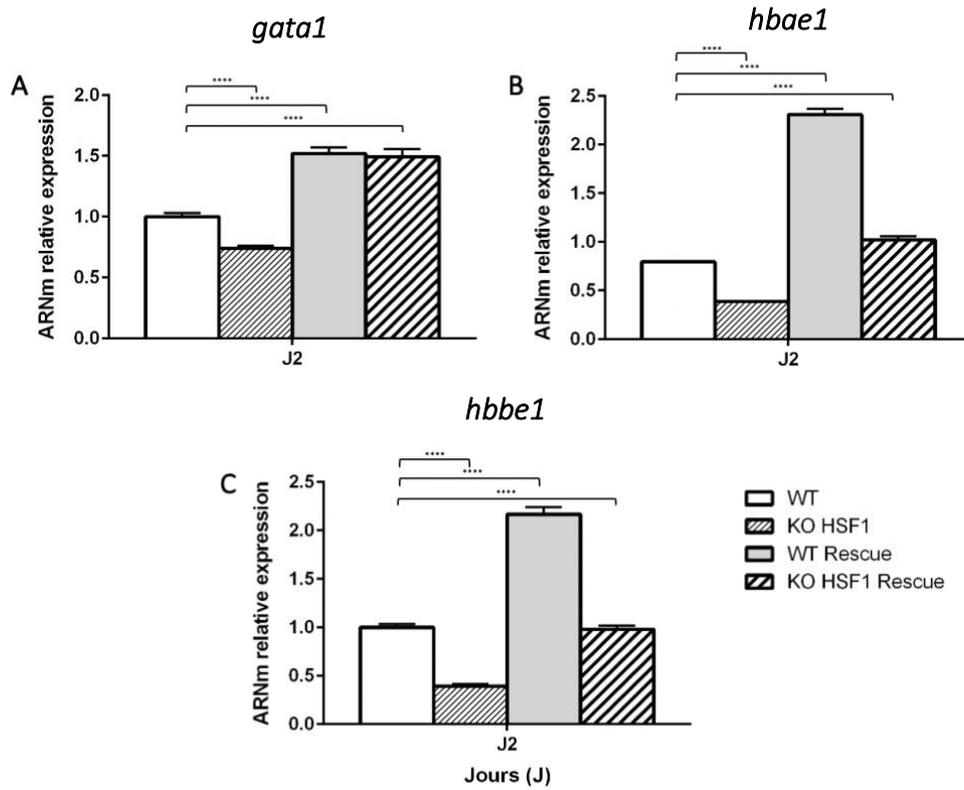


Figure 37 Résultat de RT-qPCR du gène *gata1* (A), *hbae1* (B) et *hbbe1* (C) à 48 hpf après rescue par injection d'ARNm d'HSF1 humain dans les poissons zèbres *hsf1*^{-/-}

Légende : WT : Poisson zèbre témoin, KO HSF1 : poisson zèbre KO pour le gène *hsf1* (test t ; **** P<0,0001, n=3).

VI. Effet du knock-out de *hsf1* sur l'hématopoïèse définitive

Nous avons observé que le knock-out du gène *hsf1* chez le poisson zèbre entraînait une diminution du nombre d'érythrocytes et donc semblait jouer un rôle dans l'érythropoïèse primitive du poisson zèbre.

Nous avons voulu vérifier si le KO *hsf1* avait également un rôle sur l'érythropoïèse définitive. Nous avons donc réalisé des dissections de la moelle rénale et de la rate chez des poissons zèbres adultes WT et *hsf1*^{-/-} âgés de 6 mois.

Préalablement à la dissection, nous avons réalisé une ponction cardiaque. Le sang ponctionné a été étalé sur une lame pour réaliser un frottis (Figure 38 A et B).

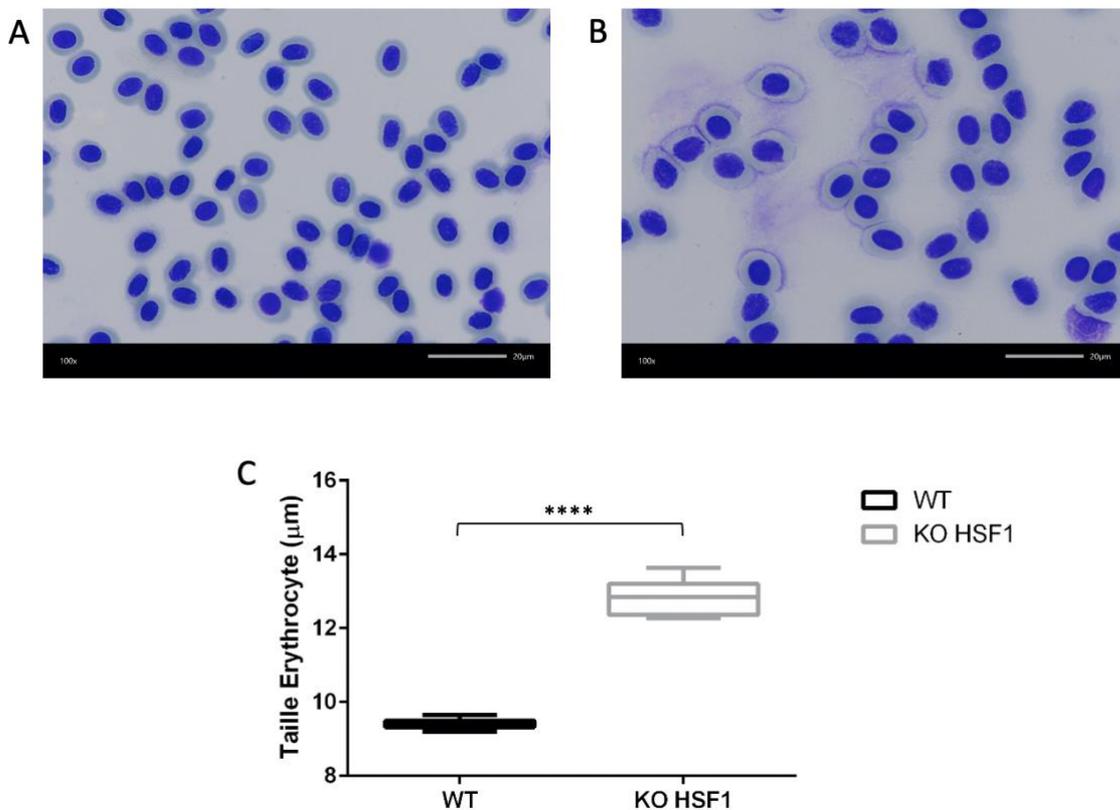


Figure 38 La taille des érythrocytes des poissons zèbres *hsf1*^{-/-} adultes est augmentée par rapport à celle des érythrocytes des poissons zèbres WT adultes

Légende : Érythrocytes de poissons zèbres WT (A) et *hsf1*^{-/-} (B) âgés de 6 mois. (C) Mesures en µm de la longueur de l'érythrocyte à 6 mois chez les poissons zèbres WT (n=10) et *hsf1*^{-/-} (n=10) ; dans les boxplots, les cases délimitent le 1er quartile et 3^{ème} quartile, les lignes horizontales centrales désignent les médianes, les moustaches représentent les limites supérieure et inférieure (ANOVA ; **** p<0,0001)

A partir de ces frottis, une mesure de la taille des érythrocytes a été réalisée (Figure 38C). On observe que la taille des érythrocytes des poissons zèbres *hsf1*^{-/-} adultes (n=10) est augmentée

par rapport à celle des érythrocytes des poissons zèbres WT adultes (n=10) : 12,8 μ m vs 9,39 μ m, soit une augmentation environ de 27%.

Dans les poissons zèbres adultes, l'ensemble des cellules sanguines sont produites dans le rein et ressemblent morphologiquement aux cellules sanguines des mammifères sauf pour les érythrocytes qui sont nucléés chez le poisson zèbre contrairement à ceux des mammifères.

Néanmoins, l'aorte est intimement associée au rein et ne peut être disséquée séparément. Par conséquent, le rein et l'aorte ont été prélevés ensemble et nommés la moelle rénale.

En 2003, Traver et Zon (233) ont montré que plusieurs populations hématopoïétiques distinctes pouvaient être isolées chez le poisson zèbre adulte par cytométrie en flux en fonction de la taille (Forward Scatter) et de la granularité (Side Scatter) des particules.

En effet, les cellules érythroïdes matures se trouvent exclusivement dans une fraction FSC(low). Les cellules myélomonocytaires, comprenant les macrophages/monocytes, les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles, peuvent être localisées dans une population FSC(high)SSC(high). Les cellules lymphoïdes peuvent être analysées dans un sous-ensemble FSC(int)SSC(low) et les précurseurs immatures sont retrouvés dans un sous-ensemble FSC(high)SSC(int).

L'ensemble des résultats obtenus suite à la dissection de la moelle rénale et de la rate après analyse par cytométrie en flux se trouve dans le **Tableau 2** et la **Figure 39**.

	Pourcentage de cellules (%)			
	Érythrocytes	Lymphocytes	Myéломonocytes	Précurseurs
Moelle rénale				
WT (6 mois) n=3	41,7 ± 11,1	15,1 ± 2,1	21,5 ± 4,0	5,1 ± 1,2
KO HSF1 (6 mois) n=3	39,3 ± 4,2	17,6 ± 4,4	22,0 ± 4,1	5,4 ± 2,6
Rate				
WT (6 mois) n=4	79,4 ± 5,2	7,5 ± 4,4	3,0 ± 0,9	1,2 ± 0,7
KO HSF1 (6 mois) n=3	78,5 ± 5,8	5,7 ± 3,1	2,8 ± 1,9	1,8 ± 0,8

Tableau 2 Pourcentage des principales populations hématopoïétiques isolables dans les organes hématopoïétiques adultes de la rate et de la moelle épinière chez les poissons zèbres *hsf1*^{-/-}
Légende : WT : Poisson zèbre témoin, KO HSF1 : poisson zèbre KO pour le gène *hsf1*. Moyenne ± SEM.

Au niveau de la moelle rénale (**Tableau 2** et **Figure 39 A et B**), on observe que les populations hématopoïétiques peuvent être principalement séparées en deux grands ensembles : les globules rouges et les globules blancs. Les érythrocytes représentent environ 40% des cellules hématopoïétiques tandis que les leucocytes représentés par les lymphocytes et les myéломonocytes représentent également environ 40% que ce soit chez les poissons zèbres adultes WT et *hsf1*^{-/-}.

Au niveau de la rate (**Tableau 2** et **Figure 39 C et D**), on note essentiellement des érythrocytes qui représentent environ 80% du total des cellules hématopoïétiques de l'organe avec une proportion de lymphocytes et de myéломonocytes plus faible que ce soit chez les poissons adultes WT et *hsf1*^{-/-}.

De façon général, on ne note pas de différence significative au niveau de la quantité des érythrocytes dans la rate et la moelle rénale dans les 2 populations de poissons zèbres WT et *hsf1*^{-/-}.

En parallèle de l'analyse des cellules hématopoïétiques dans la moelle rénale, chaque population a été isolée séparément pour une analyse histologique après fixation sur une lame par cytopsin et coloration MGG (**Figure 39 A et B**).

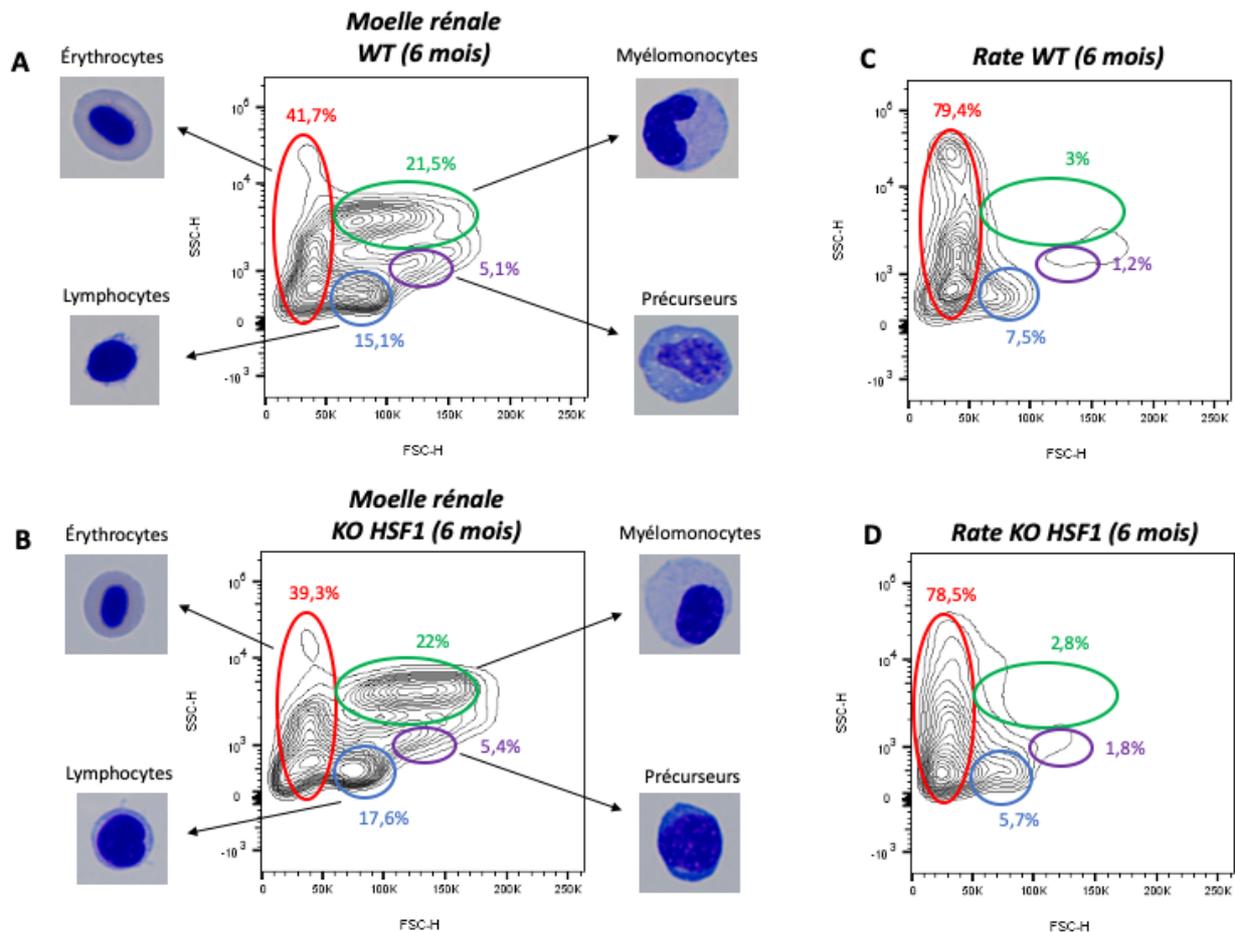


Figure 39 Séparation des principales lignées de cellules sanguines de la moelle rénale et de la rate chez les poissons zèbres adultes WT et *hsf1*^{-/-}

Légende : WT : Poisson zèbre témoin, KO HSF1 : poisson zèbre KO pour le gène *hsf1*, Cercle rouge : pourcentage moyen d'érythrocytes, Cercle vert : pourcentage moyen de myélomonocytes, Cercle bleu : pourcentage moyen de lymphocytes et Cercle violet : pourcentage moyen de précurseurs dans chaque organe. Analyse par cytométrie en flux (FACS Aria-III) de la moelle rénale de poisson zèbre adulte WT (A) (n=3) et *hsf1*^{-/-} (B) (n=3). Images histologiques (A) et (B) obtenues après un cytopsin des populations isolées par cytométrie en flux et coloration MGG. Analyse par cytométrie en flux (LSR FORTESSA) de la rate de poisson zèbre adulte WT (C) et *hsf1*^{-/-} (D).

Les populations hématopoïétiques (érythrocytes, lymphocytes, myélomonocytes et précurseurs) isolées à partir de la moelle rénale du poisson zèbre WT n'ont montré aucune différence morphologique par rapport aux populations analysées chez le poisson zèbre adulte *hsf1*^{-/-} lorsqu'elles ont été observées à partir de préparations de cytopsin tandis que les érythrocytes provenant de frottis sanguins de KO *hsf1* sont plus importants.

A la lecture de ces résultats, le knock-out du gène *hsf1* chez le poisson zèbre ne semble pas avoir d'impact sur l'hématopoïèse définitive du poisson zèbre.

VII. Effet du knock-out de *hsf1* sur la myélopoïèse

Suite à l'effet du knock-out du gène *hsf1* sur l'érythropoïèse primitive du poisson zèbre, nous avons également observé l'effet du KO *hsf1* sur la myélopoïèse.

Parmi les facteurs hématopoïétiques marqueurs de la myélopoïèse, nous avons étudié par RT-qPCR l'expression du gène *spi1/pu1*, marqueur des précurseurs myéloïdes ; du gène *mpo* (*myéloperoxydase*), marqueur des granulocytes à l'origine des neutrophiles, basophiles et éosinophiles ; et du gène *lcp1* (*l-plastin*), marqueur des leucocytes dont notamment les macrophages (Figure 40).

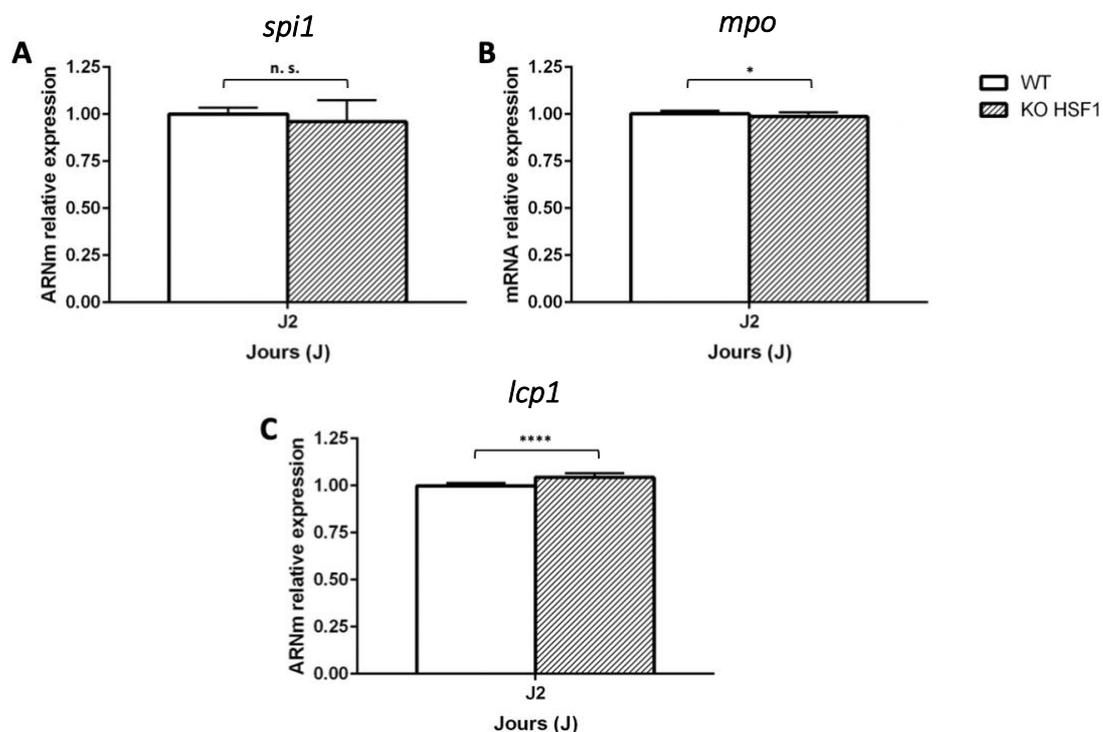


Figure 40 Résultat de RT-qPCR du gène *spi1* (A), *mpo* (B) et *lcp1* (C) à 48hpf des poissons zèbres knock-out pour le gène *hsf1*

Légende : WT : Poisson zèbre témoin, KO HSF1 : poisson zèbre KO pour le gène *hsf1* (t-TEST ; **** $p < 0,0001$; * $p < 0,0375$; n.s $p > 0,05$, n=3)

A 48 hpf, aucune différence significative dans l'expression du gène *spi1* entre les embryons WT et les embryons KO *hsf1* n'est observée. A l'inverse, l'expression du gène *mpo* et *lcp1* diffère significativement entre les 2 échantillons. Néanmoins, au vu de la faible variation d'expression du gène *mpo* (1,00 vs 0,986) et du gène *lcp1* (1,00 vs 1,042) chez les embryons KO *hsf1* par rapport aux embryons WT, il est difficile de conclure d'un rôle du gène *hsf1* sur l'expression de ces 2 gènes.

Il semble que le KO du gène *hsf1* n'entraîne pas de changement dans l'expression des facteurs de myélopoïèse *pu.1*, *mpo* et *lcp1* mais nous avons voulu regarder si ce KO n'avait pas un impact sur la régulation des cellules myéloïdes de façon indépendante de ces principaux facteurs. Pour vérifier cela, une coloration a été réalisée sur les cellules myéloïdes avec un marquage des macrophages par le rouge neutre (Figure 41).

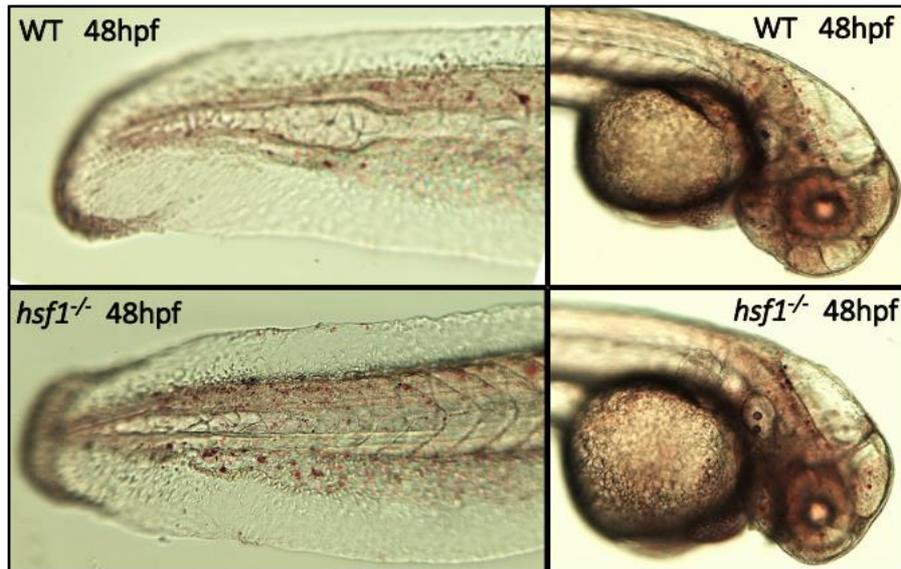


Figure 41 Observation à 48hpf des macrophages chez les embryons WT et KO *hsf1* après coloration.

Les colorations révèlent qu'il n'y a pas de changements significatifs au niveau du nombre de ces cellules entre les embryons WT et les embryons KO *hsf1*.

A la lecture de ces résultats, le knock-out du gène *hsf1* chez le poisson zèbre ne semble pas avoir d'impact sur la myélopoïèse primitive du poisson zèbre.

DISCUSSION

Nous avons voulu par ces expériences évaluer l'impact d'HSF1 dans l'érythropoïèse chez le poisson zèbre, modèle animal particulièrement adapté à cette problématique.

En effet, au cours des dix dernières années, des études sur les *HSPs* avaient montré que la protéine *HSP70* d'une part régulait l'érythropoïèse en protégeant GATA-1 du clivage par la caspase 3 (213), et d'autre part entraînait une érythropoïèse inefficace dans les β -thalassémies par séquestration par les globines α libres (216). De même, la protéine *HSP27* serait impliquée dans le contrôle GATA-1 durant la différenciation érythroïde (218).

Comme la transcription des gènes *HSPs* est contrôlée principalement par HSF1, le gène *HSF1* pourrait jouer un rôle direct dans l'érythropoïèse d'autant plus que l'érythropoïèse est un phénomène considéré comme indépendant de tout type de stress.

En effet, les résultats préliminaires obtenus chez le poisson zèbre par notre équipe avec l'utilisation d'un morpholino étaient encourageants : l'utilisation d'un morpholino (Nadhir Yousfi, non publié) dirigé contre le gène *hsf1* permettait une invalidation mais seulement transitoire car l'effet disparaissait au bout de 5 jours environ. Il n'était donc pas possible de suivre dans le temps l'effet de l'invalidation sur l'érythropoïèse du poisson zèbre. C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers la technique CRISPR/Cas9 (231) qui permet de réaliser un modèle stable d'invalidation du gène *hsf1* par knock-out. Cependant, la volonté d'obtenir un modèle d'invalidation « stable » nécessite le développement de lignées, et 3 générations sont nécessaires pour obtenir une génération homozygote KO *hsf1*.

Dans un premier temps, nous avons validé la bonne insertion de notre cassette possédant les 3 codons stop dans le génome de nos poissons zèbres homozygotes par PCR et séquençage, puis nous avons validé sur un plan fonctionnel notre modèle knock-out *hsf1* aussi bien par RT-qPCR que par Western-Blot en montrant l'absence de transcription du gène *hsp70* en condition de choc thermique. Néanmoins, la technique CRISPR/Cas9 entraîne fréquemment des modifications génétiques non ciblées (« off-targets ») pouvant altérer la fonction de gènes autrement intacts. En effet, la liaison de la séquence cible peut tolérer des mésappariements allant jusqu'à plusieurs paires de bases, ce qui signifie qu'il peut exister plusieurs sites de liaison possibles. L'algorithme CHOPCHOP nous a indiqué qu'avec la séquence cible utilisée, il pouvait exister un autre site de liaison si notre séquence cible subissait 3 mésappariements parmi ses 20 paires de base. De nombreuses techniques existent pour valider définitivement notre modèle mais elles sont toutes complexes à mettre en place. Le séquençage du génome entier est une alternative ce d'autant que le poisson zèbre offre l'avantage d'avoir son génome

entièrement séquencé depuis 2013 ; celui-ci peut donc servir de génome de référence pour faire des déductions ; néanmoins, cette méthode est coûteuse.

Dans un deuxième temps, nous avons observé l'effet de l'inactivation définitive du gène *hsf1* sur le développement du poisson zèbre caractérisé par une survie des embryons *hsf1*^{-/-} diminuée par rapport aux embryons WT. De plus, nous avons retrouvé une microphthalmie développée lors des premiers jours de développement chez les embryons *hsf1*^{-/-} survivants comme cela avait déjà été mis en évidence lors de l'utilisation d'un morpholino ciblant l'ARNm de *hsf1* (225). En revanche, aucune autre modification au niveau du phénotype n'a été mise en évidence suite à l'observation au microscope.

Dans un troisième temps, nous avons validé l'absence d'expression de la protéine Hsp70 en condition de choc thermique dans nos poissons zèbres KO *hsf1*^{-/-} ce qui témoigne de l'efficacité de notre knock-out. Néanmoins, l'insertion de notre séquence d'oligonucléotide introduit un codon STOP prématuré au moment de la traduction de l'exon 9 du gène *hsf1* sur les 13 exons que possède le gène du poisson zèbre. Il serait pertinent d'étudier par RT-PCR les ARNm de *hsf1* des poissons zèbres *hsf1*^{-/-}, notamment avec des amorces localisées dans les premiers exons, pour observer la présence ou l'absence de l'ARNm. Si l'ARNm est absent cela signifie qu'il a été dégradé par NMD (Non-sens Mediated Decay). En revanche, si l'ARNm n'est pas dégradé, il en résulte une protéine tronquée pouvant avoir une activité résiduelle. Il serait donc également intéressant de réaliser un Western-Blot pour étudier la protéine Hsf1 potentiellement traduite dans nos poissons zèbres *hsf1*^{-/-}. En effet, en 2018, Kijima et son équipe (234) ont montré *in vitro* que la protéine humaine HSF1 tronquée, dépourvu du domaine HR-C, était capable de se trimériser et de se fixer sur l'HSE d'*HSP70* mais sans pour autant entraîner l'activation de la transcription du gène *HSP70*.

Dans un quatrième temps, par des approches de génomique fonctionnelle, nous avons développé des arguments en faveur de l'implication du gène *hsf1* dans l'érythropoïèse chez le poisson zèbre, en l'absence de choc thermique. En 2020, Zhao et son équipe (208) ont démontré *in vitro* qu'HSF1, en plus de réguler l'expression du gène de la γ -globine, régulait également l'expression du gène β -globine dans les stades de développement érythroïdes adultes en se liant directement au site LCR HS3 des gènes β -globine. Dans notre étude, le phénotype global des morphants et des mutants CRISPR *hsf1* chez le poisson-zèbre, en l'absence de choc thermique, correspond à une anémie. En effet, nous avons observé : une diminution de l'expression des gènes des chaînes α et β de globine par RT-qPCR associée à une

diminution de l'hémoglobine dans les érythrocytes circulants par une coloration *o*-dianisidine à 48 hpf dans notre modèle knock-out pour le gène *hsf1*. Nous avons aussi démontré que *hsf1* était nécessaire pour la maturation des érythrocytes primitifs qui est régulée par le facteur de transcription hématopoïétique *gata1* (58). En effet, l'expression de *gata1* semble diminuer lorsque Hsf1 diminue et la comparaison de la morphologie des érythrocytes (41) entre les embryons KO *hsf1* et les embryons contrôles a révélé une inhibition de la maturation des érythrocytes dans les embryons KO *hsf1* avec un noyau granuleux et une chromatine moins condensée par rapport aux érythrocytes des embryons contrôles. Nous avons donc observé une diminution de l'expression des gènes érythropoïétiques par RT-qPCR, il serait pertinent d'observer par hybridation *in situ* si la localisation de l'expression de *gata1* et des chaînes α - et β -globine est modifiée ou non dans nos poissons zèbres suite au KO *hsf1*. De même, l'étude de la morphologie des érythrocytes primitifs *via* la réalisation d'un frottis permettrait d'observer si un retard de maturation est toujours présent dans nos poissons zèbres KO *hsf1*.

Dans un cinquième temps, nous avons réalisé des croisements entre notre génération F2 KO *hsf1* et des lignées transgéniques porteuses d'un marqueur fluorescent pour permettre une étude plus fine de l'impact de notre KO au niveau hématopoïétique (233). En effet, il serait par ailleurs intéressant d'étudier l'expression des gènes impliqués dans l'érythropoïèse par RT-qPCR à 24 hpf pour observer l'effet de *hsf1* sur les premiers stades de l'hématopoïèse primitive mais ceci est rendu complexe par la forte variation de l'ensemble des facteurs durant les deux premiers jours de développement chez le poisson zèbre. L'utilisation d'un marqueur fluorescent pouvant être quantifiée par cytométrie en flux permettrait de pallier ce problème mais notre modèle KO *hsf1* ne possédait pas de marqueur fluorescent permettant une analyse par cytométrie en flux. Ainsi, des croisements ont été réalisés avec différentes lignées : *Tg(gata1:DsRed)* dont l'ensemble des cellules exprimant *gata1* vont fluorescer en rouge et *Tg(globine:GFP)* dont l'ensemble des globines vont fluorescer en vert. Néanmoins, pour chaque nouvelle lignée, deux générations successives étaient nécessaires avant d'obtenir une génération homozygote 100%. Les nouveaux modèles obtenus *Tg(hsf1^{-/-}/globine:GFP)* et *Tg(hsf1^{-/-}/gata1:DsRed)* ont confirmé les résultats observés par RT-qPCR et les colorations avec une diminution de l'expression de la protéine Gata1 associée à une diminution du nombre de globules rouges suite à l'invalidation définitive du gène *hsf1* par rapport aux poissons zèbres témoins. Il serait intéressant de réaliser une étude cinétique de la quantification des érythrocytes dans notre lignée *Tg(hsf1^{-/-}/globine:GFP)* de J1 à J6 par cytométrie en flux pour

analyser plus finement l'évolution du nombre d'érythrocyte dans notre modèle au cours des premiers jours de développement du poisson zèbre.

Enfin, pour confirmer ces résultats, une expérimentation de type « sauvetage » des embryons KO *hsf1* a été réalisée au stade 1 cellule par injection d'ARNm de *HSF1* humain, pour confirmer la restauration d'un taux de globine normal. En effet, l'injection d'ARNm humain dans le poisson zèbre a déjà été réalisée dans d'autres modèles : par exemple, van Rooijen (235) a sauvé le phénotype *vhl*^{-/-}, gène de la voie de l'hypoxie, en injectant de l'ARNm humain *VHL*. Nous avons pu observer une restauration du phénotype à forte concentration malgré l'utilisation de la forme humaine d'*HSF1*. Cependant, il serait intéressant de réaliser une étude pour voir si *HSF1* humain permet aussi une restauration d'un taux d'érythrocytes circulants.

Dans un sixième temps, nous avons également étudié l'impact de l'invalidation définitive du gène *hsf1* sur l'érythropoïèse définitive du poisson zèbre en réalisant des études de cytométrie en flux et d'histologie sur deux organes majeurs de l'hématopoïèse adulte : le rein et la rate (18,233). Aucune différence aussi bien sur le nombre que sur la morphologie des quatre populations hématopoïétiques : érythrocytes, lymphocytes, myélomonocytes et précurseurs n'a été mise en évidence à partir de préparations de cytopspin tandis que les érythrocytes provenant de frottis sanguins de KO *hsf1* étaient plus importants. Cette différence de résultats au niveau de la morphologie des érythrocytes entre le cytopspin et le frottis sanguin peut s'expliquer par la différence de réalisation des deux techniques. En effet, le cytopspin est une technique de concentration cellulaire par centrifugation qui présente l'inconvénient de déformer les cellules ce qui peut rendre délicat leur identification ou gommer des différences. De plus, il serait intéressant d'analyser l'expression des gènes embryonnaires et adultes de l'hémoglobine par RT-qPCR pour confirmer l'absence d'effet du KO *hsf1* sur l'érythropoïèse définitive du poisson zèbre.

Ainsi, l'ensemble de ces éléments semble plaider en faveur d'un rôle clé d'*hsf1* dans l'érythropoïèse primitive du poisson zèbre.

Néanmoins, le knock-out d'*hsf1* chez le poisson zèbre entraîne une diminution de l'expression d'*hsp70* en condition normale. Il a été montré qu'une inhibition d'*hsp70*, en l'absence de choc thermique, entraînait une perte de protection de *gata1* et donc une apoptose des érythroblastes (213). Il serait donc intéressant de réaliser un sauvetage d'*hsp70* par injection au stade 1 cellule dans nos embryons de poissons zèbres KO *hsf1* de l'ARN d'*hsp70* du poisson zèbre ou de l'*HSP70* humain pour observer dans un premier temps, l'impact

d'HSP70 sur l'érythropoïèse et dans un deuxième temps, s'il est possible de restaurer un taux d'érythrocyte normal indépendamment ou non de Hsf1.

Enfin, notre équipe a montré qu'une délétion d'HSF1 avait un effet négatif sur la transcription des gènes ciblés par SPI1/PU.1 et la différenciation des macrophages chez la souris et des cellules humaines *in vitro*. Cependant, nos résultats, aussi bien de RT-qPCR que de coloration, ne montrent pas d'effet significatif sur la myélopoïèse suite à l'invalidation définitive du gène *hsf1* chez le poisson zèbre. Néanmoins, nous avons réalisé un croisement entre notre modèle *hsf1*^{-/-} et une lignée *Tg(fms:mCherry)*, dont l'ensemble des macrophages fluorescent en rouge, qui nous permettra d'observer plus finement l'effet du KO *hsf1* sur la différenciation des macrophages du poisson zèbre.

CONCLUSION

L'obtention d'un modèle knock-out pour le gène *hsf1* par la technique de CRISPR/CAS9 chez le poisson zèbre nous a permis d'évaluer le rôle du facteur de transcription *hsf1* dans l'érythropoïèse chez le poisson zèbre.

Nos résultats montrent que le facteur de transcription Hsf1 jouerait un rôle dans l'érythropoïèse primitive du poisson zèbre même si plusieurs expériences complémentaires sont encore nécessaires pour comprendre l'action de *hsf1* sur les mécanismes de régulation de l'hématopoïèse et plus précisément de l'érythropoïèse primitive.

Néanmoins, nos résultats confirment les premiers résultats observés par différentes équipes sur l'action directe d'HSF1 sur l'érythropoïèse (208) et confirment le rôle de l'ensemble des facteurs de la réponse au choc thermique sur l'érythropoïèse en absence de condition de stress (186,203,208,213,216,218,236,237).

L'étude de ces nouvelles voies de signalisation de façon plus détaillée constituera un pas en avant pour mieux comprendre les maladies liées à une perturbation de ce processus. Par conséquent, nous ne sommes encore qu'au début de la mise en évidence du potentiel de ce modèle d'inactivation du gène *hsf1* chez le poisson zèbre dans l'érythropoïèse.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* [Internet]. 1995 [cited 2019 Jun 23]; Available from: <https://onlinelibrary-wiley-com.gate2.inist.fr/doi/abs/10.1002/aja.1002030302>
2. Porcher J-M, Delahaye C, Hervin D, Brion F, Poulsen V. Caractérisation du développement embryo-larvaire chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) et comparaison des tests de toxicité aiguë sur les stades embryo-larvaire et adulte. *MEDDDE*. 2003;22.
3. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013 Apr 25;496(7446):498–503.
4. Amores A. Zebrafish hox Clusters and Vertebrate Genome Evolution. *Science*. 1998 Nov 27;282(5394):1711–4.
5. Ishikawa T, Griffin KJP, Banerjee U, Herschman HR. The zebrafish genome contains two inducible, functional cyclooxygenase-2 genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jan 5;352(1):181–7.
6. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987 Dec;169(12):5429–33.
7. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*. 2007 Mar 23;315(5819):1709–12.
8. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*. 2013 Feb 15;339(6121):819–23.
9. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 2012 Aug 17;337(6096):816–21.
10. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011 Mar;471(7340):602–7.
11. Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. 2014 Mar;507(7490):62–7.

12. TechOzyme : cyberlettre technique d'Ozyme : les outils pour la mise en œuvre de la technologie CRISPR/Cas9 [Internet]. [cited 2019 Jul 1]. Available from: <https://www.ozyme.fr/ressources/cyberlettres/techozyme/techozyme25-crispr-cas9.asp>
13. Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol.* 2013 Mar;31(3):227–9.
14. Hruscha A, Krawitz P, Rechenberg A, Heinrich V, Hecht J, Haass C, et al. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development.* 2013 Dec 15;140(24):4982–7.
15. Zon LI. Developmental Biology of Hematopoiesis. *Blood.* 1995;86:2876–91.
16. Palis J. Yolk-sac hematopoiesis The first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol.* 2001 Aug;29(8):927–36.
17. Warga RM, Nüsslein-Volhard C. Origin and development of the zebrafish endoderm. *Development.* 1999;126:827–38.
18. Davidson AJ, Zon LI. The 'definitive' (and 'primitive') guide to zebrafish hematopoiesis. *Oncogene.* 2004 Sep;23(43):7233–46.
19. Liao EC, Paw BH, Oates AC, Pratt SJ, Postlethwait JH, Zon LI. SCL/Tal-1 transcription factor acts downstream of cloche to specify hematopoietic and vascular progenitors in zebrafish. *Genes Dev.* 1998 Jan 3;12(5):621–6.
20. Sumanas S, Joriniak T, Lin S. Identification of novel vascular endothelial-specific genes by the microarray analysis of the zebrafish cloche mutants. *Blood.* 2005 Jul 15;106(2):534–41.
21. Long Q, Meng A, Wang H, Jessen JR, Farrell MJ, Lin S. GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene. *Development.* 1997;124:4105–11.
22. Brownlie A, Hersey C, Oates AC, Paw BH, Falick AM, Witkowska HE, et al. Characterization of embryonic globin genes of the zebrafish. *Dev Biol.* 2003 Mar;255(1):48–61.
23. Chan F-Y, Robinson J, Brownlie A, Shivdasani RA, Donovan A, Brugnara C, et al. Characterization of Adult α - and β -Globin Genes in the Zebrafish. *Blood.* 1997;89(2):688–700.

24. Weinstein BM, Schier AF, Abdelilah S, Malicki J, Solnica-Krezel L, Stemple DL, et al. Hematopoietic mutations in the zebrafish. *Development*. 1996;123:303–9.
25. Bennett CM. Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio*. *Blood*. 2001 Aug 1;98(3):643–51.
26. Lieschke GJ, Oates AC, Paw BH, Thompson MA, Hall NE, Ward AC, et al. Zebrafish SPI-1 (PU.1) Marks a Site of Myeloid Development Independent of Primitive Erythropoiesis: Implications for Axial Patterning. *Dev Biol*. 2002 Jun;246(2):274–95.
27. Bertrand JY, Kim AD, Violette EP, Stachura DL, Cisson JL, Traver D. Definitive hematopoiesis initiates through a committed erythromyeloid progenitor in the zebrafish embryo. *Dev Camb Engl*. 2007 Dec;134(23):4147–56.
28. Chen AT, Zon LI. Zebrafish blood stem cells. *J Cell Biochem*. 2009;108(1):35–42.
29. Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. *Dev Camb Engl*. 2013 Jun 15;140(12):2463–7.
30. Kalev-Zylinska M, Horsfield J, Flores M, Postlethwait J. Runx1 is required for zebrafish blood and vessel development and expression of a human RUNX1-CBF2T1 transgene advances a model for studies of leukemogenesis. *Development*. 2002;129:2015–30.
31. Bertrand JY, Kim AD, Teng S, Traver D. CD41+ c-myb+ precursors colonize the zebrafish pronephros by a novel migration route to initiate adult hematopoiesis. *Dev Camb Engl*. 2008 May;135(10):1853–62.
32. Jin H, Xu J, Wen Z. Migratory path of definitive hematopoietic stem/progenitor cells during zebrafish development. *Blood*. 2007 Jun 15;109(12):5208–14.
33. Zhang XY, Rodaway ARF. SCL-GFP transgenic zebrafish: In vivo imaging of blood and endothelial development and identification of the initial site of definitive hematopoiesis. *Dev Biol*. 2007 Jul;307(2):179–94.
34. Carradice D, Lieschke GJ. Zebrafish in hematology: sushi or science? *Blood*. 2008 Apr 1;111(7):3331–42.
35. Jagadeeswaran P, Sheehan JP, Craig FE, Troyer D. Identification and characterization of zebrafish thrombocytes. *Br J Haematol*. 1999;107(4):731–8.
36. Langenau DM, Zon LI. The zebrafish: a new model of T-cell and thymic development. *Nat Rev Immunol*. 2005 Apr;5(4):307–17.

37. Nakahata T, Ogawa M. Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors. *J Clin Invest.* 1982 Dec;70(6):1324–8.
38. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol.* 1963;62(3):327–36.
39. Cantú I, Philipsen S. Flicking the switch: adult hemoglobin expression in erythroid cells derived from cord blood and human induced pluripotent stem cells. *Haematologica.* 2014 Nov 1;99(11):1647–9.
40. Chasis JA, Mohandas N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood.* 2008 Aug 1;112(3):470–8.
41. Qian F, Zhen F, Xu J, Huang M, Li W, Wen Z. Distinct Functions for Different *scl* Isoforms in Zebrafish Primitive and Definitive Hematopoiesis. *PLoS Biol* [Internet]. 2007 May [cited 2020 Feb 1];5(5). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1858710/>
42. Ransom DG, Haffter P, Odenthal J, Brownlie A, Vogelsang E, Kelsh RN, et al. Characterization of zebrafish mutants with defects in embryonic hematopoiesis. :9.
43. Kingsley PD, Malik J, Fantauzzo KA, Palis J. Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. *Blood.* 2004 Jul 1;104(1):19–25.
44. Perutz MF. Structure of Hemoglobin. *Nature.* 1960;185:416–22.
45. Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. *Blood.* 73:1081–104.
46. Maniatis T, Fritsch EF, Lauer J, Lawn RM. The Molecular Genetics of Human Hemoglobins. *Annu Rev Genet.* 1980;14(1):145–78.
47. Luchi I. Chemical and physiological properties of the larval and the adult hemoglobins in rainbow trout, *salmo gairdneri* irideus. *Comp Biochem Physiol.* 1973;44B:1087–101.
48. Ganis JJ, Hsia N, Trompouki E, de Jong JLO, DiBiase A, Lambert JS, et al. Zebrafish globin Switching Occurs in Two Developmental Stages and is Controlled by the LCR. *Dev Biol.* 2012 Jun 15;366(2):185–94.
49. Sankaran VG, Xu J, Orkin SH. Advances in the understanding of haemoglobin switching. *Br J Haematol.* 2010 Apr;149(2):181–94.
50. Stamatoyannopoulos G. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Exp Hematol.* 2005 Mar;33(3):259.

51. Evans T, Reitman M, Felsenfeld G. An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Aug;85(16):5976–80.
52. Weiss MJ, Orkin SH. GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Exp Hematol*. 1995 Feb;23(2):99–107.
53. Merika M, Orkin SH. DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol*. 1993 Jul;13(7):3999–4010.
54. Martin DI, Orkin SH. Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. *Genes Dev*. 1990 Jan 11;4(11):1886–98.
55. Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 29;93(22):12355–8.
56. Zon LI, Yamaguchi Y, Yee K, Albee EA, Kimura A, Bennett JC. Expression of mRNA for the GATA-Binding Proteins in Human Eosinophils and Basophils: Potential Role in Gene Transcription. :8.
57. Martin DIK, Zon LI, Mutter G, Orkin SH. Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. *Nature*. 1990 Mar;344(6265):444–7.
58. Ohneda K, Yamamoto M. Roles of Hematopoietic Transcription Factors GATA-1 and GATA-2 in the Development of Red Blood Cell Lineage. *Acta Haematol*. 2002;108(4):237–45.
59. Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S. GATA1 Function, a Paradigm for Transcription Factors in Hematopoiesis. *Mol Cell Biol*. 2005 Feb;25(4):1215–27.
60. Pevny L, Lin C-S, D'Agati V, Simon MC, Orkin SH, Costantini F. Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-. *Development*. 1995;121:163–72.
61. Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai S-F, D'Agati V, et al. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature*. 1991 Jan;349(6306):257–60.
62. Takahashi S, Shimizu R, Suwabe N, Kuroha T, Yoh K, Ohta J, et al. GATA factor transgenes under GATA-1 locus control rescue germline GATA-1 mutant deficiencies. *Blood*. 2000 Aug 1;96(3):910–6.

63. Takahashi S, Onodera K, Motohashi H, Suwabe N, Hayashi N, Yanai N, et al. Arrest in Primitive Erythroid Cell Development Caused by Promoter-specific Disruption of the GATA-1 Gene. *J Biol Chem*. 1997 May 9;272(19):12611–5.
64. McDevitt MA, Shivdasani RA, Fujiwara Y, Yang H, Orkin SH. A “knockdown” mutation created by cis-element gene targeting reveals the dependence of erythroid cell maturation on the level of transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 24;94(13):6781–5.
65. Ciovacco WA, Raskind WH, Kacena MA. Human Phenotypes Associated with GATA-1 Mutations. *Gene*. 2008 Dec 31;427(1–2):1–6.
66. Kramer MF, Gunaratne P, Ferreira GC. Transcriptional regulation of the murine erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase gene. *Gene*. 2000 Apr;247(1–2):153–66.
67. Chretien S, Dubart A, Beaupain D, Raich N, Grandchamp B, Rosa J, et al. Alternative transcription and splicing of the human porphobilinogen deaminase gene result either in tissue-specific or in housekeeping expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Jan;85(1):6–10.
68. Boulanger L, Sabatino DE, Wong EY, Cline AP, Garrett LJ, Garbarz M, et al. Erythroid Expression of the Human α -Spectrin Gene Promoter Is Mediated by GATA-1- and NF-E2-binding Proteins. *J Biol Chem*. 2002 Nov 1;277(44):41563–70.
69. Steiner LA, Maksimova Y, Schulz V, Wong C, Raha D, Mahajan MC, et al. Chromatin Architecture and Transcription Factor Binding Regulate Expression of Erythrocyte Membrane Protein Genes. *Mol Cell Biol*. 2009 Oct;29(20):5399–412.
70. Wall L, deBoer E, Grosveld F. The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. *Genes Dev*. 1988 Jan 9;2(9):1089–100.
71. Zon LI, Youssoufian H, Mather C, Lodish HF, Orkin SH. Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Dec 1;88(23):10638–41.
72. Gregory T, Yu C, Ma A, Orkin SH, Blobel GA, Weiss MJ. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood*. 1999 Jul 1;94(1):87–96.
73. Detrich HW, Kieran MW, Chan FY, Barone LM, Yee K, Rundstadler JA, et al. Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Nov 7;92(23):10713–7.

74. Rombough P, Drader H. Hemoglobin enhances oxygen uptake in larval zebrafish (*Danio rerio*) but only under conditions of extreme hypoxia. *J Exp Biol.* 2009 Mar 15;212(6):778–84.
75. Grillitsch S. The influence of environmental PO₂ on hemoglobin oxygen saturation in developing zebrafish *Danio rerio*. *J Exp Biol.* 2005 Jan 15;208(2):309–16.
76. Lyons SE, Lawson ND, Lei L, Bennett PE, Weinstein BM, Liu PP. A nonsense mutation in zebrafish *gata1* causes the bloodless phenotype in vlad tepes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Apr 16;99(8):5454–9.
77. Belele CL, English MA, Chahal J, Burnetti A, Finckbeiner SM, Gibney G, et al. Differential requirement for Gata1 DNA binding and transactivation between primitive and definitive stages of hematopoiesis in zebrafish. *Blood.* 2009 Dec 10;114(25):5162–72.
78. Cantor AB, Orkin SH. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene.* 2002 May;21(21):3368–76.
79. Tsang AP, Fujiwara Y, Hom DB, Orkin SH. Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev.* 1998 Apr 15;12(8):1176–88.
80. Cantor AB, Orkin SH. Coregulation of GATA factors by the Friend of GATA (FOG) family of multitype zinc finger proteins. *Semin Cell Dev Biol.* 2005 Feb 1;16(1):117–28.
81. Nichols KE, Crispino JD, Poncz M, White JG, Orkin SH, Maris JM, et al. Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet.* 2000 Mar;24(3):266–70.
82. Amigo JD, Ackermann GE, Cope JJ, Yu M, Cooney JD, Ma D, et al. The role and regulation of friend of GATA-1 (FOG-1) during blood development in the zebrafish. *Blood.* 2009 Nov 19;114(21):4654–63.
83. Merika M, Orkin SH. Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Krüppel family proteins Sp1 and EKLF. *Mol Cell Biol.* 1995 May;15(5):2437–47.
84. Hodge D, Coghill E, Keys J, Maguire T, Hartmann B, McDowall A, et al. A global role for EKLF in definitive and primitive erythropoiesis. *Blood.* 2006 Apr 15;107(8):3359–70.
85. Southwood CM, Downs KM, Bieker JJ. Erythroid Krüppel-like factor exhibits an early and sequentially localized pattern of expression during mammalian erythroid ontogeny. *Dev Dyn.* 1996;206(3):248–59.

86. Tewari R, Gillemans N, Wijgerde M, Nuez B, von Lindern M, Grosveld F, et al. Erythroid Krüppel-like factor (EKLF) is active in primitive and definitive erythroid cells and is required for the function of 5'HS3 of the beta-globin locus control region. *EMBO J.* 1998 Apr 15;17(8):2334–41.
87. Nuez B, Michalovich D, Bygrave A, Ploemacher R, Grosveld F. Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature.* 1995 May;375(6529):316–8.
88. Oates AC, Pratt SJ, Vail B, Yan Y, Ho RK, Johnson SL, et al. The zebrafish *klf* gene family. *Blood.* 2001 Sep 15;98(6):1792–801.
89. Xue Y, Gao S, Liu F. Genome-wide analysis of the zebrafish *Klf* family identifies two genes important for erythroid maturation. *Dev Biol.* 2015 Jul;403(2):115–27.
90. Nerlov C, Querfurth E, Kulesa H, Graf T. GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood.* 2000 Apr 15;95(8):2543–51.
91. Nerlov C, Graf T. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev.* 1998 Aug 1;12(15):2403–12.
92. Galloway JL, Wingert RA, Thisse C, Thisse B, Zon LI. Loss of *Gata1* but Not *Gata2* Converts Erythropoiesis to Myelopoiesis in Zebrafish Embryos. *Dev Cell.* 2005 Jan;8(1):109–16.
93. Rhodes J, Hagen A, Hsu K, Deng M, Liu TX, Look AT, et al. Interplay of Pu.1 and *Gata1* Determines Myelo-Erythroid Progenitor Cell Fate in Zebrafish. *Dev Cell.* 2005 Jan;8(1):97–108.
94. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Nov;82(22):7580–4.
95. Broudy VC, Tait JF, Powell JS. Recombinant human erythropoietin: Purification and analysis of carbohydrate linkage. *Arch Biochem Biophys.* 1988 Sep 1;265(2):329–36.
96. Lai PH, Everett R, Wang FF, Arakawa T, Goldwasser E. Structural characterization of human erythropoietin. *J Biol Chem.* 1986 May 3;261(7):3116–21.
97. Dubé S, Fisher JW, Powell JS. Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion, and biological function. *J Biol Chem.* 1988 Nov 25;263(33):17516–21.
98. Tsuda E, Kawanishi G, Ueda M, Masuda S, Sasaki R. The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. *Eur J Biochem.* 1990;188(2):405–11.

99. Sytkowski AJ, Feldman L, Zurbuch DJ. Biological activity and structural stability of N-deglycosylated recombinant human erythropoietin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Apr 30;176(2):698–704.
100. Congote LF. Regulation of fetal liver erythropoiesis. *J Steroid Biochem.* 1977 May;8(5):423–8.
101. Bonsdorff E, Jalavisto E. A Humoral Mechanism in Anoxic Erythrocytosis. *Acta Physiol Scand.* 1948;16(2–3):150–70.
102. Mitjavila MT, Natazawa M, Brignaschi P, Debili N, Breton-Gorius J, Vainchenker W. Effects of five recombinant hematopoietic growth factors on enriched human erythroid progenitors in serum-replaced cultures. *J Cell Physiol.* 1989;138(3):617–23.
103. Kieran MW, Perkins AC, Orkin SH, Zon LI. Thrombopoietin rescues in vitro erythroid colony formation from mouse embryos lacking the erythropoietin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Aug 20;93(17):9126–31.
104. Rankin EB, Biju MP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Johnson RS, et al. Hypoxia-inducible factor–2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest.* 2007 Apr 2;117(4):1068–77.
105. Watowich SS. Activation of erythropoietin signaling by receptor dimerization. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999 Oct 1;31(10):1075–88.
106. Huang LJ, Constantinescu SN, Lodish HF. The N-Terminal Domain of Janus Kinase 2 Is Required for Golgi Processing and Cell Surface Expression of Erythropoietin Receptor. *Mol Cell.* 2001 Dec 1;8(6):1327–38.
107. Remy I, Wilson IA, Michnick SW. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science.* 1999 Feb 12;283(5404):990–3.
108. Wojchowski DM, Gregory RC, Miller CP, Pandit AK, Pircher TJ. Signal Transduction in the Erythropoietin Receptor System. *Exp Cell Res.* 1999 Nov 25;253(1):143–56.
109. Koury MJ, Bondurant MC. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science.* 1990 Apr 20;248(4953):378–81.
110. Haifeng B, Jacobs-Helber SM, Lawson AE, Penta K, Wickrema A, Sawyer ST. Protein Kinase B (c-Akt), Phosphatidylinositol 3-Kinase, and STAT5 Are Activated by Erythropoietin (EPO) in HCD57 Erythroid Cells But Are Constitutively Active in an EPO-Independent, Apoptosis-Resistant Subclone (HCD57-SREI Cells). *Blood.* 1999;93(11):17.

111. Paffett-Lugassy N, Hsia N, Fraenkel PG, Paw B, Leshinsky I, Barut B, et al. Functional conservation of erythropoietin signaling in zebrafish. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2718–26.
112. Chu C-Y, Cheng C-H, Chen G-D, Chen Y-C, Hung C-C, Huang K-Y, et al. The zebrafish erythropoietin: Functional identification and biochemical characterization. *FEBS Lett*. 2007;581(22):4265–71.
113. Dooley K. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr Opin Genet Dev*. 2000 Jun 1;10(3):252–6.
114. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet*. 2007 May;8(5):353–67.
115. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 1980 Oct 1;287(5785):795–801.
116. Brenner S. The Genetics of *CAENORHABDITIS ELEGANS*. *Genetics*. 1974 May;77(1):71–94.
117. Mullins MC, Hammerschmidt M, Haffter P, Nüsslein-Volhard C. Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate. *Curr Biol*. 1994 Mar;4(3):189–202.
118. Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, Neuhauss SCF, Malicki J, Stemple DL, et al. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development*. 123:37–46.
119. Bertrand JY, Traver D. Hematopoietic cell development in the zebrafish embryo. *Curr Opin Hematol*. 2009 Jul;16(4):243.
120. Paik EJ, Zon LI. Hematopoietic development in the zebrafish. *Int J Dev Biol*. 2010;54(6–7):1127–37.
121. Gore AV, Pillay LM, Galanternik MV, Weinstein BM. The zebrafish: A fantastic model for hematopoietic development and disease. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2018;7(3):e312.
122. Ransom DG, Bahary N, Niss K, Traver D, Burns C, Trede NS, et al. The Zebrafish moonshine Gene Encodes Transcriptional Intermediary Factor 1 γ , an Essential Regulator of Hematopoiesis. *PLoS Biol* [Internet]. 2004 Aug [cited 2020 Feb 1];2(8). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC509301/>

123. Stainier DYR, Weinstein BM, Iii HWD, Zon LI, Fishman MC. *cloche*, an early acting zebrafish gene, is required by both the endothelial and hematopoietic lineages. :10.
124. Reischauer S, Stone OA, Villasenor A, Chi N, Jin S-W, Martin M, et al. *Cloche* is a bHLH-PAS transcription factor that drives haemato-vascular specification. *Nature*. 2016 Jul;535(7611):294–8.
125. Kulkeaw K, Sugiyama D. Zebrafish erythropoiesis and the utility of fish as models of anemia. *Stem Cell Res Ther*. 2012 Dec;3(6):55.
126. Brownlie A, Donovan A, Pratt SJ, Paw BH, Oates AC, Brugnara C, et al. Positional cloning of the zebrafish *sauternes* gene: a model for congenital sideroblastic anaemia. *Nat Genet*. 1998 Nov;20(3):244–50.
127. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, et al. Positional cloning of zebrafish *ferroportin1* identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*. 2000 Feb;403(6771):776–81.
128. Montosi G, Donovan A, Totaro A, Garuti C, Pignatti E, Cassanelli S, et al. Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the *ferroportin* (*SLC11A3*) gene. *J Clin Invest*. 2001 Aug 15;108(4):619–23.
129. Gordeuk VR. Congenital disorder of oxygen sensing: association of the homozygous Chuvash polycythemia VHL mutation with thrombosis and vascular abnormalities but not tumors. *Blood*. 2004 May 15;103(10):3924–32.
130. Liao EC, Paw BH, Peters LL, Zapata A, Pratt SJ, Do CP, et al. Hereditary spherocytosis in zebrafish *riesling* illustrates evolution of erythroid β -spectrin structure, and function in red cell morphogenesis and membrane stability. :10.
131. Shafizadeh E. Congenital anemia in zebrafish blood mutants. :12.
132. Denecke J, Marquardt T. Congenital dyserythropoietic anemia type II (CD_{AI}/HEMPAS): Where are we now? *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2009 Sep;1792(9):915–20.
133. Paw BH, Davidson AJ, Zhou Y, Li R, Pratt SJ, Lee C, et al. Cell-specific mitotic defect and dyserythropoiesis associated with erythroid band 3 deficiency. *Nat Genet*. 2003 May;34(1):59–64.
134. Ritossa F. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones*. 1996 Jun;1(2):97–8.

135. Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *J Mol Biol.* 1974 Apr;84(3):389–98.
136. Pirkkala L, Nykänen P, Sistonen L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J.* 2001 May;15(7):1118–31.
137. Yamamoto N, Takemori Y, Sakurai M, Sugiyama K, Sakurai H. Differential recognition of heat shock elements by members of the heat shock transcription factor family. *FEBS J.* 2009;276(7):1962–74.
138. Sorger PK, Pelham HRB. Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell.* 1988 Sep;54(6):855–64.
139. Clos J, Westwood JT, Becker PB, Wilson S, Lambert K, Wu C. Molecular cloning and expression of a hexameric *Drosophila* heat shock factor subject to negative regulation. *Cell.* 1990 Nov;63(5):1085–97.
140. Nakai A. New aspects in the vertebrate heat shock factor system: Hsf3 and Hsf4. *Cell Stress Chaperones.* 1999 Jun;4(2):86–93.
141. Fujimoto M, Hayashida N, Katoh T, Oshima K, Shinkawa T, Prakasam R, et al. A Novel Mouse HSF3 Has the Potential to Activate Nonclassical Heat-Shock Genes during Heat Shock. *Mol Biol Cell.* 2010 Jan 1;21(1):106–16.
142. Dayalan Naidu S, Dinkova-Kostova AT. Regulation of the mammalian heat shock factor 1. *FEBS J.* 2017 Jun 1;284(11):1606–27.
143. McMillan DR, Xiao X, Shao L, Graves K, Benjamin JJ. Targeted Disruption of Heat Shock Transcription Factor 1 Abolishes Thermotolerance and Protection against Heat-inducible Apoptosis. *J Biol Chem.* 1998 Mar 27;273(13):7523–8.
144. Trinklein ND, Murray JI, Hartman SJ, Botstein D, Myers RM. The Role of Heat Shock Transcription Factor 1 in the Genome-wide Regulation of the Mammalian Heat Shock Response. *Mol Biol Cell.* 2004 Mar;15(3):1254–61.
145. Åkerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Aug;11(8):545–55.
146. Hahn J-S, Hu Z, Thiele DJ, Iyer VR. Genome-Wide Analysis of the Biology of Stress Responses through Heat Shock Transcription Factor. *Mol Cell Biol.* 2004 Jun;24(12):5249–56.

147. Mahat DB, Salamanca HH, Duarte FM, Danko CG, Lis JT. Mammalian Heat Shock Response And Mechanisms Underlying Its Genome-wide Transcriptional Regulation. *Mol Cell*. 2016 Apr 7;62(1):63–78.
148. Le Masson F, Razak Z, Kaigo M, Audouard C, Charry C, Cooke H, et al. Identification of Heat Shock Factor 1 Molecular and Cellular Targets during Embryonic and Adult Female Meiosis ν . *Mol Cell Biol*. 2011 Aug;31(16):3410–23.
149. Mendillo ML, Santagata S, Koeva M, Bell GW, Hu R, Tamimi RM, et al. HSF1 Drives a Transcriptional Program Distinct from Heat Shock to Support Highly Malignant Human Cancers. *Cell*. 2012 Aug;150(3):549–62.
150. Abane R, Mezger V. Roles of heat shock factors in gametogenesis and development. *FEBS J*. 2010;277(20):4150–72.
151. Santos SD, Saraiva MJ. Enlarged ventricles, astrogliosis and neurodegeneration in heat shock factor 1 null mouse brain. *Neuroscience*. 2004 Jan 1;126(3):657–63.
152. Homma S, Jin X, Wang G, Tu N, Min J, Yanasak N, et al. Demyelination, Astrogliosis, and Accumulation of Ubiquitinated Proteins, Hallmarks of CNS Disease in hsf1-Deficient Mice. *J Neurosci*. 2007 Jul 25;27(30):7974–86.
153. Takii R, Inouye S, Fujimoto M, Nakamura T, Shinkawa T, Prakasam R, et al. Heat Shock Transcription Factor 1 Inhibits Expression of IL-6 through Activating Transcription Factor 3. *J Immunol*. 2010 Jan 15;184(2):1041–8.
154. Inouye S, Izu H, Takaki E, Suzuki H, Shirai M, Yokota Y, et al. Impaired IgG Production in Mice Deficient for Heat Shock Transcription Factor 1. *J Biol Chem*. 2004 Oct 9;279(37):38701–9.
155. Xiao X, Zuo X, Davis AA, McMillan DR, Curry BB, Richardson JA, et al. HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *EMBO J*. 1999 Nov 1;18(21):5943–52.
156. Carpenter RL, Gökmen-Polar Y. HSF1 as a Cancer Biomarker and Therapeutic Target. *Curr Cancer Drug Targets*. 2019;19(7):515–24.
157. Tang D, Khaleque MA, Jones EL, Theriault JR, Li C, Hung Wong W, et al. Expression of heat shock proteins and heat shock protein messenger ribonucleic acid in human prostate carcinoma in vitro and in tumors in vivo. *Cell Stress Chaperones*. 2005 Mar;10(1):46–58.

158. Hoang AT, Huang J, Rudra-Ganguly N, Zheng J, Powell WC, Rabindran SK, et al. A Novel Association between the Human Heat Shock Transcription Factor 1 (HSF1) and Prostate Adenocarcinoma. *Am J Pathol*. 2000 Mar;156(3):857–64.
159. Santagata S, Hu R, Lin NU, Mendillo ML, Collins LC, Hankinson SE, et al. High levels of nuclear heat-shock factor 1 (HSF1) are associated with poor prognosis in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Nov 8;108(45):18378–83.
160. Dai C, Whitesell L, Rogers AB, Lindquist S. Heat Shock Factor 1 Is a Powerful Multifaceted Modifier of Carcinogenesis. *Cell*. 2007 Sep 21;130(6):1005–18.
161. Chatterjee S, Burns TF. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach. *Int J Mol Sci [Internet]*. 2017 Sep 15 [cited 2020 Feb 8];18(9). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5618627/>
162. Jaeger AM, Pemble CW, Sistonen L, Thiele DJ. Structures of HSF2 Reveal Mechanisms for Differential Regulation of Human Heat Shock Factors. *Nat Struct Mol Biol*. 2016 Feb;23(2):147–54.
163. Kallio M, Chang Y, Manuel M, Alastalo T-P, Rallu M, Gitton Y, et al. Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. *EMBO J*. 2002 Jun 3;21(11):2591–601.
164. Wang G, Ying Z, Jin X, Tu N, Zhang Y, Phillips M, et al. Essential requirement for both hsf1 and hsf2 transcriptional activity in spermatogenesis and male fertility. *genesis*. 2004;38(2):66–80.
165. Sistonen L, Sarge KD, Phillips B, Abravaya K, Morimoto RI. Activation of heat shock factor 2 during hemin-induced differentiation of human erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol*. 1992 Sep;12(9):4104–11.
166. Tanabe M, Sasai N, Nagata K, Liu X-D, Liu PCC, Thiele DJ, et al. The Mammalian HSF4 Gene Generates Both an Activator and a Repressor of Heat Shock Genes by Alternative Splicing. *J Biol Chem*. 1999 Sep 24;274(39):27845–56.
167. Kim S-A, Yoon J-H, Ahn S-G. Heat shock factor 4a (HSF4a) represses HSF2 expression and HSF2-mediated transcriptional activity. *J Cell Physiol*. 2012;227(1):1–6.
168. Fujimoto M, Izu H, Seki K, Fukuda K, Nishida T, Yamada S, et al. HSF4 is required for normal cell growth and differentiation during mouse lens development. *EMBO J*. 2004 Oct 27;23(21):4297–306.

169. Ke T, Wang QK, Ji B, Wang X, Liu P, Zhang X, et al. Novel HSF4 Mutation Causes Congenital Total White Cataract in a Chinese Family. *Am J Ophthalmol*. 2006 Aug 1;142(2):298-303.e2.
170. Forsheo T, Johnson CA, Khaliq S, Pasha S, Willis C, Abbasi R, et al. Locus heterogeneity in autosomal recessive congenital cataracts: linkage to 9q and germline HSF4 mutations. *Hum Genet*. 2005 Sep 1;117(5):452–9.
171. Smaoui N, Beltaief O, BenHamed S, M’Rad R, Maazoul F, Ouertani A, et al. A Homozygous Splice Mutation in the HSF4 Gene Is Associated with an Autosomal Recessive Congenital Cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Aug 1;45(8):2716–21.
172. Bu L, Jin Y, Shi Y, Chu R, Ban A, Eiberg H, et al. Mutant DNA-binding domain of HSF4 is associated with autosomal dominant lamellar and Marner cataract. *Nat Genet*. 2002 Jul;31(3):276–8.
173. Harrison C, Bohm A, Nelson H. Crystal Structure of the DNA Binding Domain of the Heat Shock Transcription Factor. *Science*. 1994;263:224–7.
174. Ahn S-G, Liu PCC, Klyachko K, Morimoto RI, Thiele DJ. The loop domain of heat shock transcription factor 1 dictates DNA-binding specificity and responses to heat stress. *Genes Dev*. 2001 Aug 15;15(16):2134–45.
175. Liu PCC, Thiele DJ. Modulation of Human Heat Shock Factor Trimerization by the Linker Domain. *J Biol Chem*. 1999 Jun 11;274(24):17219–25.
176. Zuo J, Rungger D, Voellmy R. Multiple layers of regulation of human heat shock transcription factor 1. *Mol Cell Biol*. 1995 Aug;15(8):4319–30.
177. Newton EM, Knauf U, Green M, Kingston RE. The regulatory domain of human heat shock factor 1 is sufficient to sense heat stress. *Mol Cell Biol*. 1996 Mar;16(3):839–46.
178. Rabindran S, Haroun R, Clos J, Wisniewski J, Wu C. Regulation of heat shock factor trimer formation: role of a conserved leucine zipper. *Science*. 1993 Jan 8;259(5092):230–4.
179. Yuan C-X, Gurley WB. Potential targets for HSF1 within the preinitiation complex. *Cell Stress Chaperones*. 2000 Jul;5(3):229–42.
180. Voellmy R, Boellmann F. Chaperone Regulation of the Heat Shock Protein Response. In: Csermely P, Vigh L, editors. *Molecular Aspects of the Stress Response: Chaperones, Membranes and Networks* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2007 [cited 2019 Jun 23]. p. 89–99. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-39975-1_9

181. Boellmann F, Guettouche T, Guo Y, Fenna M, Mnayer L, Voellmy R. DAXX interacts with heat shock factor 1 during stress activation and enhances its transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 23;101(12):4100–5.
182. Kim S-A, Yoon J-H, Lee S-H, Ahn S-G. Polo-like Kinase 1 Phosphorylates Heat Shock Transcription Factor 1 and Mediates Its Nuclear Translocation during Heat Stress. *J Biol Chem*. 2005 Apr 1;280(13):12653–7.
183. Hong S, Kim SH, Heo MA, Choi YH, Park MJ, Yoo MA, et al. Coactivator ASC-2 mediates heat shock factor 1-mediated transactivation dependent on heat shock. *FEBS Lett*. 2004;559(1–3):165–70.
184. Kline MP, Morimoto RI. Repression of the heat shock factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 1997 Apr;17(4):2107–15.
185. Satyal SH, Chen D, Fox SG, Kramer JM, Morimoto RI. Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1. *Genes Dev*. 1998 Jul 1;12(13):1962–74.
186. Weiss MJ, dos Santos CO. Chaperoning erythropoiesis. *Blood*. 2009 Mar 5;113(10):2136–44.
187. Csermely P, Schnaider T, So C, Nardai G. The 90-kDa Molecular Chaperone Family: Structure, Function, and Clinical Applications. A Comprehensive Review. *Pharmacol Ther*. 1998;79(2):129–68.
188. Richter K, Buchner J. Hsp90: Chaperoning signal transduction. *J Cell Physiol*. 2001;188(3):281–90.
189. Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005 Oct;5(10):761.
190. Song X, Wang X, Zhuo W, Shi H, Feng D, Sun Y, et al. The Regulatory Mechanism of Extracellular Hsp90 α on Matrix Metalloproteinase-2 Processing and Tumor Angiogenesis. *J Biol Chem*. 2010 Dec 17;285(51):40039–49.
191. Cecchini P, Tavano R, Polverino de Laureto P, Franzoso S, Mazzon C, Montanari P, et al. The Soluble Recombinant *Neisseria meningitidis* Adhesin NadA Δ 351–405 Stimulates Human Monocytes by Binding to Extracellular Hsp90. *PLoS ONE* [Internet]. 2011 Sep 16 [cited 2019 Jun 23];6(9). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3175003/>

192. Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, Yimlamai D, Unger C, Zehetmeier C, et al. Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 α in cancer cell invasiveness. *Nat Cell Biol.* 2004 Jun;6(6):507–14.
193. Radons J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones.* 2016 May;21(3):379–404.
194. Flaherty KM, Deluca-Flaherty C, McKay DB. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature.* 1990;346:6.
195. Shi Y, Thomas JO. The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol Cell Biol.* 1992 May;12(5):2186–92.
196. Joly A-L, Wettstein G, Mignot G, Ghiringhelli F, Garrido C. Dual Role of Heat Shock Proteins as Regulators of Apoptosis and Innate Immunity. *J Innate Immun.* 2010;2(3):238–47.
197. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol.* 2000 Aug;2(8):469–75.
198. Arrigo A-P. Mammalian HspB1 (Hsp27) is a molecular sensor linked to the physiology and environment of the cell. *Cell Stress Chaperones.* 2017 Jul;22(4):517–29.
199. Arrigo AP, Suhan JP, Welch WJ. Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. *Mol Cell Biol.* 1988 Dec;8(12):5059–71.
200. Arrigo A-P. In search of the molecular mechanism by which small stress proteins counteract apoptosis during cellular differentiation. *J Cell Biochem.* 2005;94(2):241–6.
201. De AK, Kodys KM, Yeh BS, Miller-Graziano C. Exaggerated Human Monocyte IL-10 Concomitant to Minimal TNF- α Induction by Heat-Shock Protein 27 (Hsp27) Suggests Hsp27 Is Primarily an Antiinflammatory Stimulus. *J Immunol.* 2000 Oct 1;165(7):3951–8.
202. Batulan Z, Pulakazhi Venu VK, Li Y, Koumbadinga G, Alvarez-Olmedo DG, Shi C, et al. Extracellular Release and Signaling by Heat Shock Protein 27: Role in Modifying Vascular Inflammation. *Front Immunol [Internet].* 2016 Jul 26 [cited 2019 Jun 23];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4960997/>

203. Jego G, Lanneau D, De Thonel A, Berthenet K, Hazoumé A, Droin N, et al. Dual regulation of SPI1/PU.1 transcription factor by heat shock factor 1 (HSF1) during macrophage differentiation of monocytes. *Leukemia*. 2014 Aug;28(8):1676–86.
204. Koschmieder S, Rosenbauer F, Steidl U, Owens BM, Tenen DG. Role of transcription factors C/EBPalpha and PU.1 in normal hematopoiesis and leukemia. *Int J Hematol*. 2005 Jun;81(5):368–77.
205. Rosenbauer F, Wagner K, Kutok JL, Iwasaki H, Le Beau MM, Okuno Y, et al. Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat Genet*. 2004 Jun;36(6):624–30.
206. Tatetsu H, Ueno S, Hata H, Yamada Y, Takeya M, Mitsuya H, et al. Down-regulation of PU.1 by Methylation of Distal Regulatory Elements and the Promoter Is Required for Myeloma Cell Growth. *Cancer Res*. 2007 Jun 1;67(11):5328–36.
207. Kourtis N, Lazaris C, Hockemeyer K, Baladrán JC, Jimenez AR, Mullenders J, et al. Oncogenic hijacking of the stress response machinery in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med*. 2018 Aug;24(8):1157–66.
208. Gao J, Liu J, Zhang L, Zhang Y, Guo Q, Li Y, et al. Heat shock transcription factor 1 regulates the fetal γ -globin expression in a stress-dependent and independent manner during erythroid differentiation. *Exp Cell Res*. 2020 Feb;387(2):111780.
209. Marubayashi S, Koppikar P, Taldone T, Abdel-Wahab O, West N, Bhagwat N, et al. HSP90 is a therapeutic target in JAK2-dependent myeloproliferative neoplasms in mice and humans. *J Clin Invest*. 2010 Oct 1;120(10):3578–93.
210. Fiskus W, Verstovsek S, Manshour T, Rao R, Balusu R, Venkannagari S, et al. Heat shock protein 90 inhibitor is synergistic with JAK2 inhibitor and overcomes resistance to JAK2-TKI in human myeloproliferative neoplasm cells. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011 Dec 1;17(23):7347–58.
211. Ghosh A, Garee G, Sweeny EA, Nakamura Y, Stuehr DJ. Hsp90 chaperones hemoglobin maturation in erythroid and nonerythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Feb 6;115(6):E1117–26.
212. 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 Jan 15;193(2):247–54.

213. Ribeil J-A, Zermati Y, Vandekerckhove J, Cathelin S, Kersual J, Dussiot M, et al. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*. 2007 Jan;445(7123):102–5.
214. Frisan E, Vandekerckhove J, de Thonel A, Pierre-Eugene C, Sternberg A, Arlet J-B, et al. Defective nuclear localization of Hsp70 is associated with dyserythropoiesis and GATA-1 cleavage in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012 Feb 9;119(6):1532–42.
215. Gallardo M, Barrio S, Fernandez M, Paradela A, Arenas A, Toldos O, et al. Proteomic analysis reveals heat shock protein 70 has a key role in polycythemia Vera. *Mol Cancer*. 2013 Nov 19;12:142.
216. Arlet J-B, Ribeil J-A, Guillem F, Negre O, Hazoume A, Marcion G, et al. HSP70 sequestration by free α -globin promotes ineffective erythropoiesis in β -thalassaemia. *Nature*. 2014 Oct;514(7521):242–6.
217. Guillem F, Dussiot M, Colin E, Suriyun T, Arlet JB, Goudin N, et al. XPO1 regulates erythroid differentiation and is a new target for the treatment of β -thalassemia. *Haematologica* [Internet]. 2019 Nov 21 [cited 2020 Feb 5]; Available from: <http://www.haematologica.org/content/early/2019/11/18/haematol.2018.210054>
218. de Thonel A, Vandekerckhove J, Lanneau D, Selvakumar S, Courtois G, Hazoume A, et al. HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation. *Blood*. 2010 Jul 8;116(1):85–96.
219. Sevin M, Kubovcakova L, Pernet N, Causse S, Vitte F, Villeval JL, et al. HSP27 is a partner of JAK2-STAT5 and a potential therapeutic target in myelofibrosis. *Nat Commun*. 2018 Apr 12;9(1):1–13.
220. Råbergh C, Airaksinen S, Soitamo A. Tissue-specific expression of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 1 mRNAs in response to heat stress. *J Exp Biol*. 2000;203:1817–24.
221. Yeh F-L, Hsu L-Y, Lin B-A, Chen C-F, Li I-C, Tsai S-H, et al. Cloning of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 2 (HSF2) and similar patterns of HSF2 and HSF1 mRNA expression in brain tissues. *Biochimie*. 2006 Dec;88(12):1983–8.
222. Swan CL, Evans TG, Sylvain N, Krone PH. Zebrafish HSF4: a novel protein that shares features of both HSF1 and HSF4 of mammals. *Cell Stress Chaperones*. 2012 Sep 1;17(5):623–37.

223. Saju JM, Hossain MS, Liew WC, Pradhan A, Thevasagayam NM, Tan LSE, et al. Heat Shock Factor 5 Is Essential for Spermatogenesis in Zebrafish. *Cell Rep*. 2018 Dec;25(12):3252-3261.e4.
224. Wang G, Huang H, Dai R, Lee K-Y, Lin S, Mivechi NF. Suppression of heat shock transcription factor HSF1 in zebrafish causes heat-induced apoptosis. *Genesis*. 2001;30(3):195-7.
225. Evans TG, Belak Z, Ovsenek N, Krone PH. Heat shock factor 1 is required for constitutive Hsp70 expression and normal lens development in embryonic zebrafish. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2007 Jan;146(1):131-40.
226. Krone PH, Evans TG, Blechinger SR. Heat shock gene expression and function during zebrafish embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2003 Oct;14(5):267-74.
227. Craven SE. Loss of Hspa9b in zebrafish recapitulates the ineffective hematopoiesis of the myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2005 May 1;105(9):3528-34.
228. Nagashima M, Fujikawa C, Mawatari K, Mori Y, Kato S. HSP70, the earliest-induced gene in the zebrafish retina during optic nerve regeneration: Its role in cell survival. *Neurochem Int*. 2011 Jul;58(8):888-95.
229. Mao L, Bryantsev AL, Chechenova MB, Shelden EA. Cloning, characterization, and heat stress-induced redistribution of a protein homologous to human hsp27 in the zebrafish *Danio rerio*. *Exp Cell Res*. 2005 May;306(1):230-41.
230. Tucker NR, Ustyugov A, Bryantsev AL, Konkel ME, Shelden EricA. Hsp27 is persistently expressed in zebrafish skeletal and cardiac muscle tissues but dispensable for their morphogenesis. *Cell Stress Chaperones*. 2009 Sep;14(5):521-33.
231. Labun K, Montague TG, Krause M, Torres Cleuren YN, Tjeldnes H, Valen E. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jul 2;47(W1):W171-4.
232. Rosen JN, Sweeney MF, Mably JD. Microinjection of Zebrafish Embryos to Analyze Gene Function. *J Vis Exp JoVE [Internet]*. 2009 Mar 9 [cited 2019 Jun 30];(25). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2762901/>
233. Traver D, Paw BH, Poss KD, Penberthy WT, Lin S, Zon LI. Transplantation and in vivo imaging of multilineage engraftment in zebrafish bloodless mutants. *Nat Immunol*. 2003 Dec;4(12):1238-46.
234. Kijima T, Prince TL, Tigue ML, Yim KH, Schwartz H, Beebe K, et al. HSP90 inhibitors disrupt

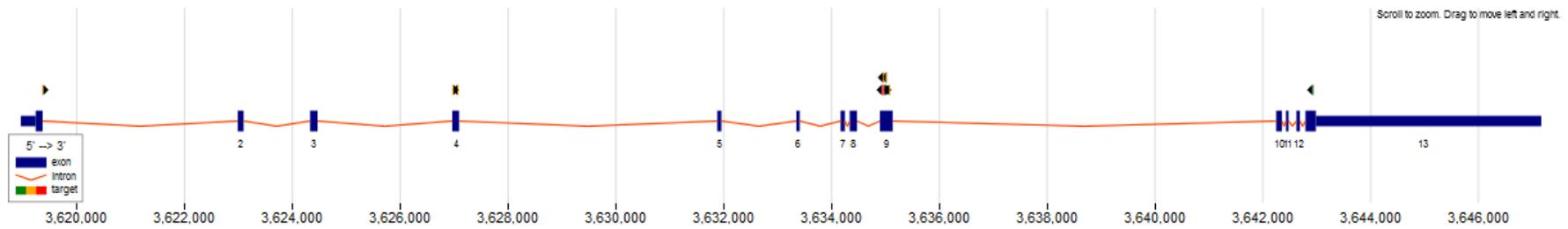
- a transient HSP90-HSF1 interaction and identify a noncanonical model of HSP90-mediated HSF1 regulation. *Sci Rep* [Internet]. 2018 Dec [cited 2020 Mar 4];8(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-25404-w>
235. Van Rooijen E, Voest EE, Logister I, et al. Zebrafish mutants in the von Hippel-Lindau tumor suppressor display a hypoxic response and recapitulate key aspects of Chuvash polycythemia. *Blood*. 2009;113(25):6449–6460.
236. Schaeffer EK, West RJ, Conine SJ, Lowrey CH. Multiple physical stresses induce γ -globin gene expression and fetal hemoglobin production in erythroid cells. *Blood Cells Mol Dis*. 2014 Apr;52(4):214–24.
237. Chen TH-P, Kambal A, Krysiak K, Walshauser MA, Raju G, Tibbitts JF, et al. Knockdown of Hspa9, a del(5q31.2) gene, results in a decrease in hematopoietic progenitors in mice. *Blood*. 2011 Feb 3;117(5):1530–9.

ANNEXE

Annexe 1 :

Résultat des sites cibles pour réaliser un knock-out du gène
HSF1 via la technique CRISPR/Cas9 après analyse avec
l'algorithme CHOPCHOP

hsf1



Download results:

[View in UCSC genome browser](#)

Ranking	Target sequence	Genomic location	Exon	Strand	GC (%)	Self-complementarity	Off-targets				Efficiency
							0	1	2	3	
1	GGCGATGGTGGGATCTTCGGTGG	chr19:3642919	13	-	65	0	0	0	0	0	0.62
2	GGCTGGGTCTGATTGCCTGTGG	chr19:3634995	9	+	61	1	0	0	0	0	0.61
3	GGCGAAAGGGCGTGTCCACAGG	chr19:3635011	9	-	70	1	0	0	0	1	0.59
4	GGTGTGATTTGGAGTCCATGG	chr19:3627064	4	-	52	3	0	0	0	1	0.43
5	GGAGCCAGTGAGTCTATTCTGG	chr19:3619362	1	+	57	1	0	0	0	1	0.35
6	GGTGTGCAATATTAACATGAGG	chr19:3626969	4	+	39	0	0	0	0	0	0.65
7	GGCGGAGTCAGGGCGGAGACTGG	chr19:3635071	9	-	74	2	0	0	0	1	0.54
8	GGACACACCTCTCCACCTCAGG	chr19:3634954	9	-	61	0	0	0	1	1	0.49
9	GGGCTGTGGGCGGGCTAGACGG	chr19:3634933	9	-	78	3	0	0	1	0	0.44
10	GGTGAAGAGGTGTCTGTGG	chr19:3634959	9	+	61	0	0	4	0	0	0.57

Ce tableau permet de connaître le classement des meilleures séquences établi par l’algorithme CHOCHOP pour réaliser un knock-out du gène HSF1 (Exon en bleu et intron en rouge) via la technique CRISPR/Cas9 (colonne « ranking »), la séquence cible de 20 paires de base correspondante constituée en 5’ de 2 paires de bases GG et en fin de séquence, du motif PAM 5’-NGG-3’ (colonne « Target sequence »), la localisation de la séquence cible au niveau du génome du poisson zèbre (colonne « Genomic location »), la localisation de la séquence cible au niveau des exons du gène HSF1 (colonne « Exon »), le brin d’ADN sur lequel la séquence cible va être complémentaire (colonne « Strand »), le pourcentage de guanine (G) et de cytosine (C) présent dans la séquence cible qui doit se trouver entre 40 et 70% pour être efficace (colonne « GC(%) ») le nombre de régions complémentaires de plus de 3 nts pouvant inhiber l’efficacité du sgARN (colonne « Self-complementarity »), le nombre de sites hors cibles si la séquence cible subit 0 (« MM0 »), 1 (« MM1 »), 2 (« MM2 »), 3 (« MM3 ») mésappariements pouvant entraîner des mutations non prévues dites « off-target » (colonne « off-targets »), et un score d’efficacité basé sur la littérature actuelle (colonne « Efficiency »).

En cliquant sur un résultat spécifique, on accède à une nouvelle page contenant le locus zoomé avec le site de coupure prédit surligné en rouge, les options de primers en violet et les sites de restriction codés par couleur selon qu’ils sont uniques ou non dans la région.

Annexe 2 :

Loss of *hsf1* leads to anemia in zebrafish embryos

Hugo CAMPARIO, Benoist Pruvot, Leticia Micaletto, Marine Cordonnier, Nadhir Yousfi, Burhan Uyanik, Carmen Garrido, François Girodon and Johanna Chluba

CAMPARIO et al, *Blood* (Soumis)

Loss of *hsf1* leads to anemia in zebrafish embryos

Hugo Campario^{1,2,3}, Benoist Pruvot^{2,3}, Leticia Micaletto³, Marine Cordonnier^{2,3}, Nadhir Yousfi², Burhan Uyanik^{2,3}, Carmen Garrido^{2,3,4*}, François Girodon^{1,2,3*#} and Johanna Chluba^{3#}

¹ Service d'Hématologie Biologique, Pôle Biologie, CHU de Dijon, France

² Inserm U1231, Label Ligue contre le Cancer, Dijon, France

³ Université de Bourgogne-Franche Comté, Inserm U1231, Dijon, France

⁴ Centre Georges François Leclerc, Dijon, France

* These authors jointly supervised this work

Correspondance :

- Joanna Chluba

UFR SVTE 6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France.

Tel +33 380396223

Fax +33 380396223

E-Mail: joanna.chluba@u-bourgogne.fr

- François Girodon

Service d'hématologie Biologique, Plateau technique de Biologie, CHU Dijon

2 rue Angélique Ducoudray, 21079 Dijon, France

Tel + 33 3 80 29 57 10

Fax + 33 3 80 29 36 60

E-Mail: francois.girodon@chu-dijon.fr

Scientific category: red blood cells

Keywords: Erythropoiesis, HSF1, CRISPR/Cas9, zebrafish

Key points

1. *hsf1* regulates primitive erythropoiesis in Zebrafish.
2. *hsf1* plays a role in erythrocyte maturation

Abstract

Heat shock proteins (HSPs) are reported to play an important role in erythropoiesis. The expression of HSP genes is mainly controlled by Heat shock factor 1 (HSF1), a highly conserved transcription factor. So far, a detailed understanding of the function of HSF1 in erythropoiesis remains uncharacterized. This study has employed zebrafish as a relevant model to investigate the role of Hsf1 during embryonic erythropoiesis. We established *hsf1*-disrupted zebrafish lines using the CRISPR/Cas9 technology and performed phenotypic analyses throughout embryogenesis. We found that Hsf1 deficient embryos had a decreased number of primitive erythrocytes, while erythrocyte number in adults was unchanged. In Hsf1 deficient embryos, expression of embryonic α and β globin genes was reduced as well as *gata1* expression.

In addition, the morphology of erythrocytes suggested an inhibition of erythrocyte maturation. On the other hand, no significant changes were observed in myeloid cells.

Altogether our results support a key role for Hsf1 in erythrocyte maturation *in vivo*.

Introduction

The heat shock response is a highly conserved mechanism, from yeast to human, which can be induced by heat, but also by oxidative stress, heavy metals, toxins or infections. The Heat shock response involves the synthesis of a superfamily of proteins called Heat Shock Proteins (HSPs), which major role is to prevent inappropriate protein aggregation or to mediate degradation or repair immature or damaged proteins^{1,2}. HSPs are also shown to play a role in normal and pathological erythropoiesis^{3,4,5}. HSP27 has been reported to control GATA-1 turnover during erythroid differentiation⁶ whereas HSP70 protects GATA-1 from caspase 3 cleavage⁷. An inefficient protection of GATA-1 by HSP70 leading to anemia has been observed in patients with β -thalassemia and myelodysplastic syndromes^{8,9}.

The HSPs are controlled of transcription factors called Heat Shock Factors (HSFs)^{10,11}. Upon activation, HSFs associate into homotrimers and induce the transcription of the *hsp* genes by binding the Heat Shock Elements (HSE) located in the 5' region of their promoter¹². In vertebrates, four HSFs (HSF1-HSF4) have been identified. HSF1 is the major stress-inducible transcriptional activator of the heat shock response. As reviewed by Vihervaara, HSF1 plays also an important role in absence of stress in development, cancer, metabolism or aging¹³.

Over the last ten years, several studies have shown the impact HSF1 on hematopoietic signaling pathways under stress and non-stress conditions. For example, HSF1 has been involved in the regulation of the transcriptional factor SPI1/PU.1 during the differentiation of monocytes into

macrophages¹⁴. HSF1 has also been reported to regulate adult β -globin gene expression *in vitro* in addition to the regulation of the expression of fetal γ -globin gene, by direct binding to the HS3 site of the LCR region of the β -globin genes¹⁵. Here, to study *in vivo* the effect of Hsf1 on erythropoiesis, we have chosen to inactivate the *hsf1* gene by the CRISPR/Cas9 technique in zebrafish.

The zebrafish (*Danio rerio*) is a vertebrate with a genetic program similar to that of humans. The *ex vivo* development of embryos and the transparency of eggs and larvae allowing the visualization of blood cells are the main advantages of this animal model. Moreover, the majority of transcription factors involved in hematopoietic differentiation in mammals have orthologs in zebrafish¹⁶, suggesting that the mechanisms regulating this differentiation are conserved and thus make zebrafish a clinically relevant model system.

Our results demonstrate that HSF1 is a key regulator of primitive erythropoiesis and maturation of erythroid cells.

Material and Method

Zebrafish Lines and maintenance. All protocols in this study were conducted in strict accordance with French and European guidelines for the care and use of laboratory animals. The experiments were performed using the wild-type line WIK (ZIRC) and the transgenic lines *Tg(gata1:DsRed)*¹⁷, and *Tg(globin:GFP)*, a gift of Julien Bertrand (Geneva, Switzerland). Zebrafish are maintained in a recirculating aquaculture system (Müller & Pfleger, Germany) at a temperature of 26-28°C (14L:10D). Eggs were collected within 1 h of laying and kept at 28 °C in Petri dishes in embryo water supplemented with 0.3 μ g/ml of methylene blue.

Generation of CRISPR/Cas9 mutants. The design of the target sequence was realized using the online web tool CHOPCHOP^{18,19} (<http://chopchop.cbu.uib.no/>) and was performed as described previously²⁰. For sgRNA synthesis, a 60 base pairs oligonucleotide called crRNA was synthesized containing the SP6 promoter sequence (5' ATTTAGGTGACACTATA 3'), the HSF1 specific target on exon 9 (5' GGCGAAAGGGGCGTGCCAC 3') and a sequence of 20 base pairs (5' GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG 3') which were annealed to the constant 80 base pair oligonucleotide at 95°C for 5 minutes²¹. The ssDNA overhangs were filled in with T4 DNA polymerase (Neb) and purified using GenElute PCR clean-Up kit (Sigma-Aldrich). The sgDNA probes obtained were transcribed into RNA with the MEGAscript SP6 kit (Ambion). All sgRNAs were DNase treated and precipitated with ammonium acetate/ethanol. RNA concentration was quantified using Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific). A specific STOP codon cassette oligonucleotide¹⁹, containing two 20-bp homology arms, flanking the predicted

Cas9 mediated breakpoint and surrounding a multiple STOP codon cassette 5'-CTGGGTCTGATTTGCCTGTGGTCATGGCGTTTAAACCTTAATTAAGCTGTTGTAGGACACGCCCTTTGCCCCA C-3', was added to the sgRNA (3 μ M). For microinjection, sgRNA (300 ng/ μ l) was mixed with Cas9 Nuclease protein NLS (600ng/ μ l; Diagenode, Seraing), and was injected with a glass injection capillary (HAVARD Apparatus) connected to a microinjector (EPPENDORF FemtoJet) into 1-cell stage zebrafish embryos. After injection, Embryos were placed in Petri dishes containing E3 medium and transferred at 28°C.

Genotyping. Primer sequences used for genotyping are listed in (Table 1-2 S1 & Figure 1-2 S1). Injected embryos were raised to adult mosaic fishes. F0 founders were identified by genotyping by PCR. F1 embryos were sampled for genotyping to confirm germline transmission of the mutation. The remaining F1 embryos were raised to adulthood and genotyped at week 10 by fin-clipping. Heterozygous knockout carrying the same mutations were selected and crossed to raise the homozygous knockout F2 generation. The homozygous F2 knockout generation for the *hsf1* gene was confirmed by sequencing (Genewiz).

Real-time quantitative PCR and analysis. 20-25 embryos were anesthetized with Benzocaine solution (40 μ L at 100mg/ml in 80mL H₂O) and put in 1mL of a solution of TRIzol[®] Reagent (Invitrogen). RNA was extracted using RNAeasy Mini Kit (Qiagen) and transcribed to cDNA using the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Fisher). Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed using the Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (Thermo Fisher) and was executed on a ViiA 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher). For each sample, expression levels were normalized by *hprt1b*. All RT-qPCR experiments were performed in biological triplicates. The primers are listed in (Table 1 S2).

O-dianisidine and Neutral Red Staining. Embryos were anaesthetized with Benzocaine solution. Detection of hemoglobin by o-dianisidine (Sigma Aldrich) was performed as described²². The staining of macrophages with neutral red (FluKa, BioChemika) was performed as described²³.

Erythrocyte morphology. Blood cells were collected from anaesthetized embryos by tail clipping. Cytospin preparations from this suspension are performed by centrifugation at 300 rpm for 5 minutes using a Shandon Cytospin 4 cytocentrifuge. The slides were stained with May-Grunwald Giemsa (MGG) according to the standard protocol and examined under the microscope. The blood of 6 months old adult zebrafish was obtained by cardiac puncture with a heparin-coated needle (50 μ g/mL) and immediately spread on an MGG staining slide.

Microscopy and Imaging. Embryo images were taken with an Axio zoom V16 (Zeiss), composed of a motorized zoom microscope, an HPX 200 C fluorescent lamp coupled with a Zeiss HRm CCD camera and a computer with ZEN image acquisition and processing software.

Flow cytometry. Cells were prepared from embryos at 48 hpf as described²⁴. For cell collection from adult zebrafish, zebrafish were euthanized in a Benzocaine solution (2x 40 μ L at 100mg/ml in 80mL H₂O). Following a ventral and medial incision¹⁷, the kidney and spleen were dissected and placed separately in a tube with iced SM (0.9X DPBS without Ca²⁺ or Mg²⁺ and 5% Fetal Veal Serum). FVS700 (BD Horizon; 1/10000) was added at to exclude dead cells and debris during flow cytometry. Tagged cells from the transgenic *Tg(gata1:DsRed)* and *Tg(globin:GFP)* lines were counted by FORTESSA LSR cell analyzer (BD Biosciences). Flow cytometry analysis and sorting was based on FVS700 (BD Horizon; 1/10000) exclusion, forward scatter and side scatter. Adult hematopoietic cells from the kidney marrow and spleen were analyzed for the parameters FSC (Forward Scatter) and SSC (Side Scatter) as described above¹⁷ using a FACS AriaII cell sorter (BD Biosciences). Cytospin preparations from these sorted cells are stained with MGG according to the standard protocol and examined under the microscope.

Western-Blot. Embryos were lysed on ice for 30 min with lysis buffer: Lysis Buffer 10X (Cell Signaling), Proteinase Inhibitor Cocktail 25X (Sigma Aldrich), Anti-phosphatase 10X (Cell Signaling). After lysis, the samples were exposed to ultrasound (20% for 10 s) and the supernatant recovered after centrifugation. After determination of protein concentration using the DcAssay kit (BioRad), the samples were deposited on acrylamide gels according to standard protocols. The primary antibodies used were HSP70 (1/1000; ADI-SPA-812, EnzoLife), β -Actin (1/1000; SC-1616, SantaCruz) and HSF1 (1/1000; 4356, Cell Signaling).

Synthesis and injection HSF1 RNA. The plasmid DNA containing human HSF1 cDNA (pcDNA-hHSF1 WT, gift from Lea Sistonen (Addgene plasmid # 71724; <http://n2t.net/addgene:71724>; RRID: Addgene_71724)²⁵, was linearized with the restriction enzyme *eglnII*. The RNA transcription reaction was performed with the mMachine T7 Transcription Kit (Invitrogen) which adds a 7-methylguanosine cap to the 5' end of the RNA. A Poly A tail was added to the 3' end of the RNA with a Poly A tailing kit (CellsScript) and the RNA was purified using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Injection of the *HSF1* mRNA was performed at the 1-cell stage. After injection, the embryos were placed in a Petri dish with E3 medium and methylene blue.

Statistics. Statistical analyses were performed using ANOVA test or unmatched Student test with Prism 6 (GraphPad Software).

Results

Deficiency of *hsf1* leads to morphological defects

The results show : HSF1 is highly conserved from human to zebrafish. The proteins have 60% similarity (**Figure 1 S3**). We have created a mutant line with the CRSIPR/Cas9 technique. Specifically, a stop codon cassette has been inserted in the exon 9 of the *hsf1* gene, creating a truncated protein missing the DNA binding domain. The *hsf1* knockout (*hsf1*^{-/-}) males and females were all fertile with normal offspring (*data not shown*). The survival rates during the first 6 days were significantly lower in the knockout (KO) (77%) than in WT embryos (93%, $p=0.0005$) (**Figure 1A**). The chorions of the *hsf1*^{-/-} embryos were larger than those of the WT embryos (**Figure 1B, C**) while there was no difference in body length at 48 hpf between WT and *hsf1*^{-/-} embryos (*data not shown*). We also observed microphthalmia in the *hsf1*^{-/-} embryos (**Figure 1D, E**) with a decrease of eye circumference of 6.43% in the KO embryos.

Hsp expression

To validate the loss of function of the truncated Hsf1, *hsf1* KO and WT embryos were exposed to a heat shock for 1 hour at 37°C and *hsp70* gene expression was analyzed by RT-qPCR. Under non heat shock conditions (**Figure 1F**), the expression of the *hsp70* gene was strongly decreased in the *hsf1*^{-/-} embryos compared to control embryos at 48 hpf (1 vs 0.27 percent, $P<0.0001$) and at 96 hpf (1 vs percent 0.33, $P<0.0001$). We observed that the expression of the *hsp70* gene increased 300 times following heat shock in control embryos at 48 hpf and 700 times at 96 hpf. On the contrary, the stimulation of the *hsp70* gene transcription was very low in *hsf1*^{-/-} embryos following the heat shock (**Figure 1G**), only 5 times at 48 hpf and 10 times at 96 hpf. The

RT-qPCR results were confirmed by western blot. Following heat shock, the expression of the Hsp70 protein was only detected in the heat-shocked WT embryos (**Figure 1H**) but not in the *hsf1* KO embryos.

hsf1 knockout affects *gata1* expression during primitive erythropoiesis

Our previous results with a *hsf1* morpholino (*hsf1*-mo) (**Figure 1 S4**) showed moderate anemia. To reveal a role of Hsf1 in our *hsf1* KO in erythropoiesis, a gene expression analysis of different erythropoietic factors in 48 hpf and 96 hpf embryos and *hsf1* KO embryos was performed by RT-qPCR. We first focused on *gata1* expression, a factor that is essential for normal erythropoiesis^{26,27} (**Figure**

2A). Indeed, compared to WT embryos, a significant decrease in the expression of 22% at 48 hpf and 23% ($P < 0.0001$) at 96 hpf was observed in *hsf1* KO embryos. To further decipher the impact of Hsf1 on *gata1* expression, the *hsf1* KO line was crossed with *Tg(gata1:DsRed)* fishes to obtain the line *Tg(hsf1^{-/-}/gata1:DsRed)*. Using imaging analysis of the embryos, red fluorescent cells were less detected in the head and in the heart than in *Tg(hsf1^{-/-}/gata1:DsRed)* embryos but also in the inter-segmental vessels compared to *Tg(gata1:DsRed)* embryos at 48 hpf and 96 hpf (**Figure 2B**). To confirm these observations, quantitation of the red fluorescent cells at 48 hpf was performed by flow cytometry. The percentage of red fluorescent cells (**Figure 3C**) was similar in *Tg(hsf1^{-/-}/gata1: DsRed)* (2.13%) and *Tg(gata1:DsRed)* embryos (2.21%, $p > 0,05$), however the mean fluorescence intensity (MFI) was four times lower in embryos of the *hsf1^{-/-}* line, confirming a lower *gata1* expression in KO compared to WT embryos (15600 vs 61530, $n=1$).

Effect of Hsf1 on embryonic globin expression

The expression of the embryonic hemoglobin genes in zebrafish²⁸ *hbae1* (α -globin chain) and *hbbe1* (β -globin chain) was quantified using RT-qPCR (**Figure 3A, B**). A decrease of 52% was noted in the expression of the *hbae1* gene and of 41% for the *hbbe1* gene at 48 hpf in *hsf1^{-/-}* embryos compared to WT embryos. This decrease persisted at 96 hpf in *hsf1^{-/-}* embryos compared to WT embryos with an expression of the *hbae1* gene of 34% and the *hbbe1* gene of 24%. Moreover, hemoglobin staining with *o*-dianisidine confirmed the RT-qPCR results showing a reduced hemoglobin staining in circulating erythrocytes in *hsf1^{-/-}* embryos at 48 hpf (**Figure 3C**) and at 96 hpf compared to WT embryos (**Figure 3D**). To further confirm these data, the *hsf1^{-/-}* fishes were crossed with the *Tg(globin:GFP)* line in order obtain embryos with green fluorescent erythrocytes. Microscopic examination of *Tg(hsf1^{-/-}/globin:GFP)* embryos of the new transgenic line showed that there were fewer erythrocytes circulating throughout the body compared to *Tg(globin:GFP)* embryos (**Figure 3E**). The results of RT-qPCR and *o*-dianisidine staining were confirmed by quantitation of the green fluorescent red blood cells by flow cytometry at 48 hpf: a 64% reduction of the green fluorescence was noted in *Tg(hsf1^{-/-}/globin:GFP)* embryos compared *Tg(globin:GFP)* embryos ($p < 0,0339$) (**Figure 3F**).

Effect of *hsf1* knockout on erythrocyte maturation

Our preliminary results supported that the invalidation of *hsf1* induced a decrease in the number of erythrocytes in zebrafish embryos. We thus sought to verify whether a difference in erythrocyte maturation between control embryos and *hsf1*^{-/-} embryos was also observed (**Figure 3G**). Indeed, after erythrocyte isolation and MGG staining, a clear difference in the morphology was noted between cells from WT and *hsf1*^{-/-} embryos. At 48 hpf, control embryos red blood cells were at the polychromatophilic erythroblast stage while the erythrocytes of the *hsf1*^{-/-} embryos were still at the basophilic erythroblast stage suggesting a slower erythroblastic maturation in *hsf1*^{-/-} embryos.

Rescue of *hsf1* knockout embryos by injection of human *HSF1* mRNA

To restore a normal erythrocyte phenotype in *hsf1*^{-/-} embryos, human *HSF1* mRNA was injected in 1-cell stage embryos. In a first step, the expression of the human protein in zebrafish was validated by western blot (**Figure 4A**). A higher expression of the Hsf1 protein was noted in KO and WT embryos injected with the *HSF1* mRNA than in control-injected WT and KO embryos. In a second step, to evaluate the impact of the rescue on the *hsf1* KO model, the expression of the *gata1*, *hbae1* and *hbbe1* genes was analyzed by RT-qPCR and revealed that for the 3 genes, a rescue was observed (**Figure 4B, C, D**).

Effect of *hsf1* knockout on definitive hematopoiesis

The zebrafish *hsf1* knockout model was therefore associated with a decrease in the number of erythrocytes at 48 hpf and 96 hpf suggesting a role of Hsf1 in primitive erythropoiesis of zebrafish. Next, we investigated whether Hsf1 could also play a role in adult erythropoiesis. Whole kidney marrow (WKM) and spleen cells from¹⁷ 6 months adult WT and *hsf1*^{-/-} zebrafish were isolated and measured for the erythrocyte size (**Figure 5A, B**). A 27% increase in erythrocyte size in adult *hsf1*^{-/-} zebrafish was noted compared to red blood cells from adult WT zebrafish. In the WKM (**Table 1 and Figure 5C, D**), the hematopoietic populations were mainly separated into two main groups including the erythrocytes (about 40% of the hematopoietic cells) and the leukocytes (about 40% with lymphocytes and myelomonocytes) both in adult zebrafish WT and *hsf1*^{-/-}. In the spleen (**Table 1 and Figure 5E, F**), there were mainly erythrocytes which represented about 80% of the total hematopoietic cells of the organ with a lower proportion of lymphocytes and myelomonocytes than in adult zebrafish WT and *hsf1*^{-/-}. Overall, there was no significant difference in erythrocyte numbers in the spleen and WKM in WT compared to *hsf1*^{-/-}. Following the analysis of hematopoietic cells in the WKM, each population was

isolated separately for histological analysis after fixation on a slide by cytospin and MGG staining (Figure 5C, D).

The hematopoietic populations (erythrocytes, lymphocytes, myelomonocytes and precursors) isolated from WKM of WT zebrafish showed no morphological differences from the populations analyzed in adult zebrafish *hsf1*^{-/-} when observed from cytospin preparations, while erythrocytes from blood smears from *hsf1* KO fishes were larger.

The effect of KO *hsf1* on myelopoiesis

We then analyzed the effect of *hsf1* gene knockout on myelopoiesis. The expression of several genes implicated in myelopoiesis was quantified by RT-qPCR, including the *spi1/pu1* gene, marker of myeloid precursors, the *mpo* gene (myeloperoxidase), marker of granulocytes at the origin of neutrophils, basophils and eosinophils and the *lcp1* gene (I-plastin), marker of leukocytes including macrophages, (Figure 6A, B, C). At 48 hpf, no significant difference in the expression of the *spi1* gene between WT and *hsf1*^{-/-} embryos was observed. A small but significant difference was observed for the expression of the *mpo* gene (1.00 vs. 0.986, p<0,0375) and the *lcp1* gene (1.00 vs. 1.042, p<0,0001) in *hsf1*^{-/-} embryos compared to WT embryos. Staining of macrophages with neutral red confirmed that there was no difference between WT and *hsf1* KO embryos (Figure 6D).

Discussion

We report here a CRISPR/Cas9 *in vivo* model for Hsf1 deficiency in zebrafish. The phenotype was characterized by small eyes, as reported for Hsf1 morphants and crispants^{29,30}. Contrary to the HF1 KO mouse³¹, the *hsf1* KO zebrafish are fertile, but with a lower viability.

In 2020, Zhao and his team¹⁵ showed that the expression of the γ -globin gene was significantly decreased *in vitro* in erythroleukemic K562 cells after the knockdown of *HSF1* during the erythroid development stages, and this was confirmed after a heat shock. Moreover, the authors hypothesized that HSF1 would also regulate the β -globin gene expression in adult erythroid developmental stages by directly binding to LCR HS3 site of β -globin genes.

In our study, the overall phenotype of morphants and CRISPR/Cas9 *hsf1* mutants in zebrafish corresponded to anemia without heat-shock condition. In our knockout model for the *hsf1* gene, anemia was associated with a decrease in the expression of the α and β globin chain genes and a decrease in hemoglobin in circulating erythrocytes.

We also demonstrated that Hsf1 was necessary for the maturation of primitive erythrocytes, which is regulated by the hematopoietic transcription factor Gata1²⁷. Indeed, *gata1* expression was decreased after *hsf1* invalidation.

In zebrafish, Qian and al³² showed that normal primary erythrocytes from 30 hpf to 5 dpf can be classified according to cell size, nucleus shape and cytoplasmic staining into four main stages. The erythrocyte morphology of *hsf1* KO embryos at 48 hpf revealed an inhibition of erythrocyte maturation as these cells had a granular nucleus and less condensed chromatin when compared to erythrocytes from control embryos.

To quantify erythrocyte numbers, we performed crosses between our *hsf1* KO and transgenic lines *Tg(gata1:DsRed)* and *Tg(globin:GFP)* to create new lines. This allowed a more precise study of the impact of our KO at the hematopoietic level as reported Traver and Zon¹⁷. The new lines confirmed the results observed by RT-qPCR, FACS analyses and *o*-dianisidine staining that showed a decrease in the number of cells expressing the *gata1* gene, associated with a decrease in the number of globin genes and hemoglobin.

Finally, to confirm our results, a rescue of *hsf1* KO embryos with human *HSF1* mRNA was performed. Indeed, a recovery of a globin-gene expression level was observed after the injection of human *HSF1* mRNA in *hsf1* KO embryos. Of note, such experiments with human mRNA have already been performed in other models: for example, van Rooijen and al³³ rescued the phenotype of the gene of hypoxia signaling *vhl*^{-/-} by injecting human *VHL* mRNA.

Finally, the impact of the invalidation of the *hsf1* gene on adult erythropoiesis of zebrafish was studied based on flow cytometry and histological analyses on two major organs of adult hematopoiesis: the whole-kidney-marrow and the spleen¹⁷. In adult zebrafish, all blood cells are produced in the kidney¹⁶ and are morphologically similar to mammalian blood cells except the presence of a nucleus in zebrafish contrary to mammalian erythrocytes³⁴. Here, no differences in the number or morphology of the four hematopoietic populations (i.e. erythrocytes, lymphocytes, myelomonocytes and precursors) were found. The only exception was the size of the erythrocytes that were larger in *hsf1* KO embryos compared to WT embryos.

On the other hand, *hsf1*-mo and knockout of *hsf1* in zebrafish lead to a delay in erythrocyte maturation, associated with a decrease in the expression of *hsp70* under normal and heat shock conditions, as shown in our *hsf1* KO. Since the inhibition of HSP70, in the absence of a heat shock, lead to a loss of

protection of GATA1 and thus to apoptosis in erythroblasts^{7,8} one can easily imagine that the inhibition of *hsf1* leads to an impaired erythropoiesis.

In conclusion: our results support a key role of *hsf1* in the primitive erythropoiesis in the zebrafish model.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the ANR - 15-CE17-0021-03 (GenRed) and ANR-11-LABX-0051 (labex GR-Ex). The authors thank the platform for FACS analysis and the Cellimap platform and Dr. Julien Bertrand for the gift of the pu.1 and *gata1* plasmids and the *Tg(globin:GFP)* line and helpful discussions.

Contributions

H.C. performed experiments, analyzed the data and wrote the manuscript; B.P. designed the guide RNAs and analyzed the data; L.M. maintained the zebrafish; M.C. performed western blot; N.Y. performed morpholino experiments; B.U. helped the cytometry results; J.C., F.G. and C.G. directed the work, supervised the experiments, analyzed the data and wrote the paper.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular Chaperones in the Cytosol: from Nascent Chain to Folded Protein. *Science*. 2002;295(5561):1852–1858.
2. Walter S, Buchner J. Molecular Chaperones—Cellular Machines for Protein Folding. *Angewandte Chemie International Edition*. 2002;41(7):1098–1113.
3. Chen TH-P, Kambal A, Krysiak K, et al. Knockdown of Hspa9, a del(5q31.2) gene, results in a decrease in hematopoietic progenitors in mice. *Blood*. 2011;117(5):1530–1539.
4. Schaeffer EK, West RJ, Conine SJ, Lowrey CH. Multiple physical stresses induce γ -globin gene expression and fetal hemoglobin production in erythroid cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2014;52(4):214–224.
5. Weiss MJ, dos Santos CO. Chaperoning erythropoiesis. *Blood*. 2009;113(10):2136–2144.

6. de Thonel A, Vandekerckhove J, Lanneau D, et al. HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation. *Blood*. 2010;116(1):85–96.
7. Ribeil J-A, Zermati Y, Vandekerckhove J, et al. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*. 2007;445(7123):102–105.
8. Arlet J-B, Ribeil J-A, Guillem F, et al. HSP70 sequestration by free α -globin promotes ineffective erythropoiesis in β -thalassaemia. *Nature*. 2014;514(7521):242–246.
9. Frisan E, Vandekerckhove J, de Thonel A, et al. Defective nuclear localization of Hsp70 is associated with dyserythropoiesis and GATA-1 cleavage in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;119(6):1532–1542.
10. Pirkkala L, Nykänen P, Sistonen L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *The FASEB Journal*. 2001;15(7):1118–1131.
11. Christians E, Yan L-J, Benjamin I. Heat shock factor 1 and heat shock proteins: Critical partners in protection against acute cell injury. *Critical Care Medicine*. 2002;30(1).
12. Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev*. 1998;12(24):3788–3796.
13. Vihervaara A, Sistonen L. HSF1 at a glance. *Journal of Cell Science*. 2014;127(2):261–266.
14. Jego G, Lanneau D, De Thonel A, et al. Dual regulation of SPI1/PU.1 transcription factor by heat shock factor 1 (HSF1) during macrophage differentiation of monocytes. *Leukemia*. 2014;28(8):1676–1686.
15. Gao J, Liu J, Zhang L, et al. Heat shock transcription factor 1 regulates the fetal γ -globin expression in a stress-dependent and independent manner during erythroid differentiation. *Experimental Cell Research*. 2020;387(2):111780.
16. Davidson AJ, Zon LI. The ‘definitive’ (and ‘primitive’) guide to zebrafish hematopoiesis. *Oncogene*. 2004;23(43):7233–7246.
17. Traver D, Paw BH, Poss KD, et al. Transplantation and in vivo imaging of multilineage engraftment in zebrafish bloodless mutants. *Nature Immunology*. 2003;4(12):1238–1246.
18. Labun K, Montague TG, Gagnon JA, Thyme SB, Valen E. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(Web Server issue):W272–W276.
19. Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA, Church GM, Valen E. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Web Server issue):W401–W407.

20. Labun K, Montague TG, Krause M, et al. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Research*. 2019;47(W1):W171–W174.
21. Mennetrier L, Lopez T, Pruvot B, et al. zHSF1 modulates zper2 expression in zebrafish embryos. *Chronobiol. Int*. 2018;35(7):1008–1015.
22. Detrich HW, Kieran MW, Chan FY, et al. Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(23):10713–10717.
23. Herbomel P, Thisse B, Thisse C. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development*. 1999;126:3735–3745.
24. H. William Detrich, Westerfield M, Zon LI. The Zebrafish: Cellular and Developmental Biology, Part B Developmental Biology, Volume 134 - 4th Edition. 2016.
25. Budzyński MA, Puustinen MC, Joutsen J, Sistonen L. Uncoupling Stress-Inducible Phosphorylation of Heat Shock Factor 1 from Its Activation. *Mol Cell Biol*. 2015;35(14):2530–2540.
26. Fujiwara T. GATA Transcription Factors: Basic Principles and Related Human Disorders. *Tohoku J. Exp. Med*. 2017;242(2):83–91.
27. Ohneda K, Yamamoto M. Roles of Hematopoietic Transcription Factors GATA-1 and GATA-2 in the Development of Red Blood Cell Lineage. *AHA*. 2002;108(4):237–245.
28. Ganis JJ, Hsia N, Trompouki E, et al. Zebrafish globin Switching Occurs in Two Developmental Stages and is Controlled by the LCR. *Dev Biol*. 2012;366(2):185–194.
29. Wang G, Huang H, Dai R, et al. Suppression of heat shock transcription factor HSF1 in zebrafish causes heat-induced apoptosis. *Genesis*. 2001;30(3):195–197.
30. Evans TG, Belak Z, Ovsenek N, Krone PH. Heat shock factor 1 is required for constitutive Hsp70 expression and normal lens development in embryonic zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2007;146(1):131–140.
31. Xiao X, Zuo X, Davis AA, et al. HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *EMBO J*. 1999;18(21):5943–5952.
32. Qian F, Zhen F, Xu J, et al. Distinct Functions for Different scl Isoforms in Zebrafish Primitive and Definitive Hematopoiesis. *PLoS Biol*. 2007;5(5):.
33. van Rooijen E, Voest EE, Logister I, et al. Zebrafish mutants in the von Hippel-Lindau tumor suppressor display a hypoxic response and recapitulate key aspects of Chuvash polycythemia. *Blood*. 2009;113(25):6449–6460.

34. Ransom DG, Haffter P, Odenthal J, et al. Characterization of zebrafish mutants with defects in embryonic hematopoiesis. *Development*. 1996;123:311–319.

Figure Legends

Figure 1 Hsf1 deficiency leads to morphological defects and decreases Hsp expression

(A) Survival curve estimated with the Kaplan-Meier method for WT zebrafish embryos compared *hsf1*^{-/-} embryos (n=100). The logrank test was used to compare the two lines (p=0.0005). (B) Images of WT and *hsf1*^{-/-} zebrafish embryos with chorions at 48 hpf taken with an Axio zoom Macroscope. (C) Measurements in μm of the chorion size eye at 48 hpf in WT and *hsf1*^{-/-} embryos (n=6); in boxplots, the boxes delimit the 1st quartile and 3rd quartile, the central horizontal lines designate the medians, the whiskers represent the upper and lower limits (ANOVA; * p<0.0417). (D) Images of dechorionated WT and *hsf1*^{-/-} zebrafish embryos at 48 hpf taken with an Axio zoom Macroscope. (E) Measurements of the eye circumference of WT and *hsf1*^{-/-} embryos (n=10) at 48 hpf; (ANOVA; *** p<0.0003). (F) Quantitative RT-PCR analysis of *hsp70* expression in WT and *hsf1*^{-/-} embryos at 48 hpf (D2) and 96 hpf (D4) with heat shock (HS) or not at 37°C for 1 hour (mean \pm SD, t-test; **** P<0.0001, n=3). (G) Quantitative RT-PCR analysis of *hsp70* expression in *hsf1*^{-/-} embryos at 48 hpf (D2) and 96 hpf (D4) with heat shock (HS) or not at 37°C for 1 hour (mean \pm SD, t-test; **** P<0.0001, n=3). (H) Western blot analysis of Hsp70 protein content of 48 hpf WT and *hsf1*^{-/-} embryos (KO) with and without subsequent heat-shock before protein extraction. β -Actin protein was used as a control to confirm that the same amount of protein was loaded in each well.

Figure 2 Effect of *hsf1* knockout on *gata1* expression during primary erythropoiesis

(A) Quantitative RT-qPCR analysis of *gata1* expression in WT and *hsf1*^{-/-} embryos at 48 hpf (D2) and 96 hpf (D4) (mean \pm SD, t-test; **** P<0.0001, n=3). (B) Images of zebrafish embryos lines *Tg(gata1:DsRed)* and *Tg(hsf1^{-/-}/gata1:DsRed)* at 48 hpf and 96 hpf taken with an Axio zoom Macroscope. (C) Flow cytometry analysis (LSRFORTESSA) of erythrocytes from *Tg(gata1:DsRed)* and *Tg(hsf1^{-/-}/gata1:DsRed)* embryos at 48hpf.

Figure 3 The Effect of *hsf1* KO on embryonic globin expression and erythrocyte maturation

(A, B) Quantitative RT-qPCR analysis of *hbae1* (A) and *hbbe1* (B) expression in WT and *hsf1*^{-/-} embryos at 48 hpf (D2) and 96 hpf (D4) (mean \pm SD, t-test; **** P<0.0001, n=3). (C) Staining of hemoglobin with O-dianisidine at 48 hpf in WT and *hsf1*^{-/-} embryos. (D) Staining of hemoglobin with O-dianisidine at 96

hpf in WT and *hsf1*^{-/-} embryos. The red arrow indicates the heart and orange arrow the kidney. (E) Images of zebrafish embryos *Tg(globin:GFP)* and *Tg(hsf1*^{-/-}*/globin:GFP)* at 48 hpf taken with an Axio zoom Macroscope. (F) Flow cytometry analysis (LSRFORTESSA) of green fluorescent erythrocytes cells in *Tg(globin:GFP)* and *Tg(hsf1*^{-/-}*/globin:GFP)* embryos at 48hpf. (G) May-Grünwald Giemsa staining of circulating red cells collected at 48 hpf. The erythrocytes of *hsf1* crispants present an immature shape in comparison to WT embryos. (100X magnification).

Figure 4 Rescue of *hsf1* knockout by injection of human HSF1 mRNA

(A) Western blot with the HSF1 antibody from 48 hpf WT and *hsf1*^{-/-} embryos after injection of human HSF1 mRNA or controls. β -Actin protein was used as a control to confirm that the same amount of protein was loaded in each well. (B, C, D) Quantitative RT-qPCR analysis of *gata1* (B), *hbae1* (C) and *hbbe1* (D) expression in *hsf1*^{-/-} embryos at 48 hpf (D2) and 96 hpf (D4) after injection of human HSF1 mRNA (mean \pm SD, *t*-test; **** $P < 0.0001$, $n = 3$).

Figure 5 The effect of *hsf1*^{-/-} on definitive hematopoiesis

(A) Measurement of the erythrocyte diameter from 6 months WT and *hsf1*^{-/-} zebrafish ($n = 10$); in boxplots, the boxes delimit the 1st quartile and 3rd quartile, the central horizontal lines designate the medians, the whiskers represent the upper and lower limits (ANOVA; **** $p < 0.0001$). (B) Images of blood smear of erythrocytes with MGG staining from 6 months WT and *hsf1*^{-/-} zebrafish (100X magnification). (C, D) Flow cytometry analysis (LSRFORTESSA) of major blood cell lineages from whole kidney marrow by FSC and SSC in WT (C) and *hsf1*^{-/-} (D) fishes ($n = 3$) at 6 months. Histological images were obtained after cytopsin of populations isolated by flow cytometry (FACS Aria-III) with MGG staining (100X magnification). (E, F) Flow cytometry (LSRFORTESSA) analysis of major blood cell lineages from spleen by FSC and SSC in WT (E) and *hsf1*^{-/-} fishes (F) ($n = 3$) at 6 months. Average percentage of erythrocytes is red circled, the green circle corresponds to the average percentage of myelomonocytes, the blue circle to the average percentage of lymphocytes and the purple circle to the average percentage of precursors in each organ.

Figure 6 The effect of *hsf1*^{-/-} on myelopoiesis

(A, B, C) Quantitative RT-qPCR analysis of *spi1* (A), *lcp1* (B), and *mpo* (C) expression in WT and *hsf1*^{-/-} embryos at 48 hpf (D2) (mean ± SD, *t*-test; **** *p*<0,0001 ; * *p*<0,0375 ; n.s *p*> 0,05, n=3). (D) Neutral red staining of macrophages at 48 hpf from WT and *hsf1*^{-/-} embryos.

Table 1 Major hematopoietic populations in adult hematopoietic organs of the spleen and whole kidney marrow in zebrafish *hsf1*^{-/-}

Numbers are presented as means, plus or minus standard deviations.

Figure 1

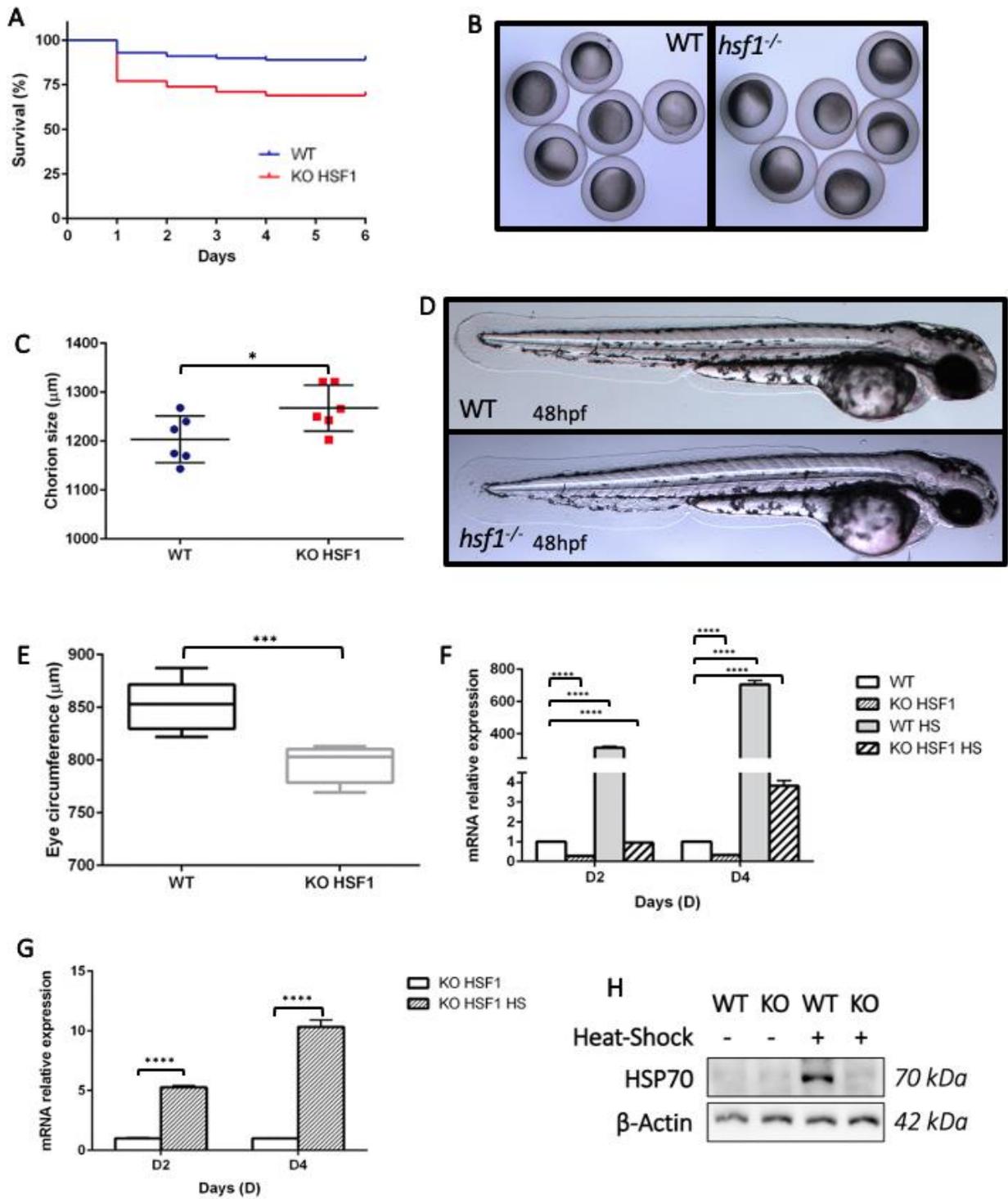


Figure 2

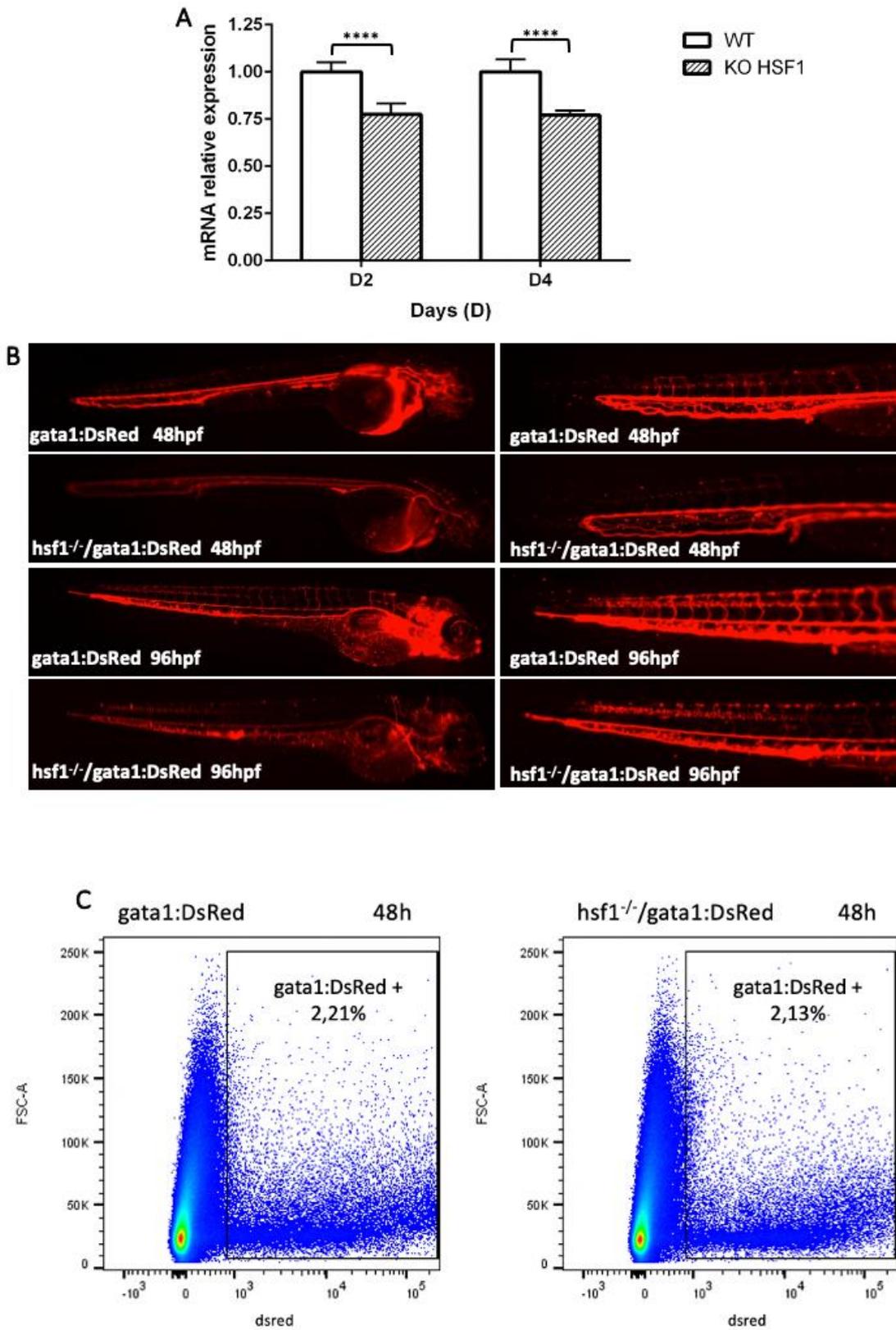


Figure 3

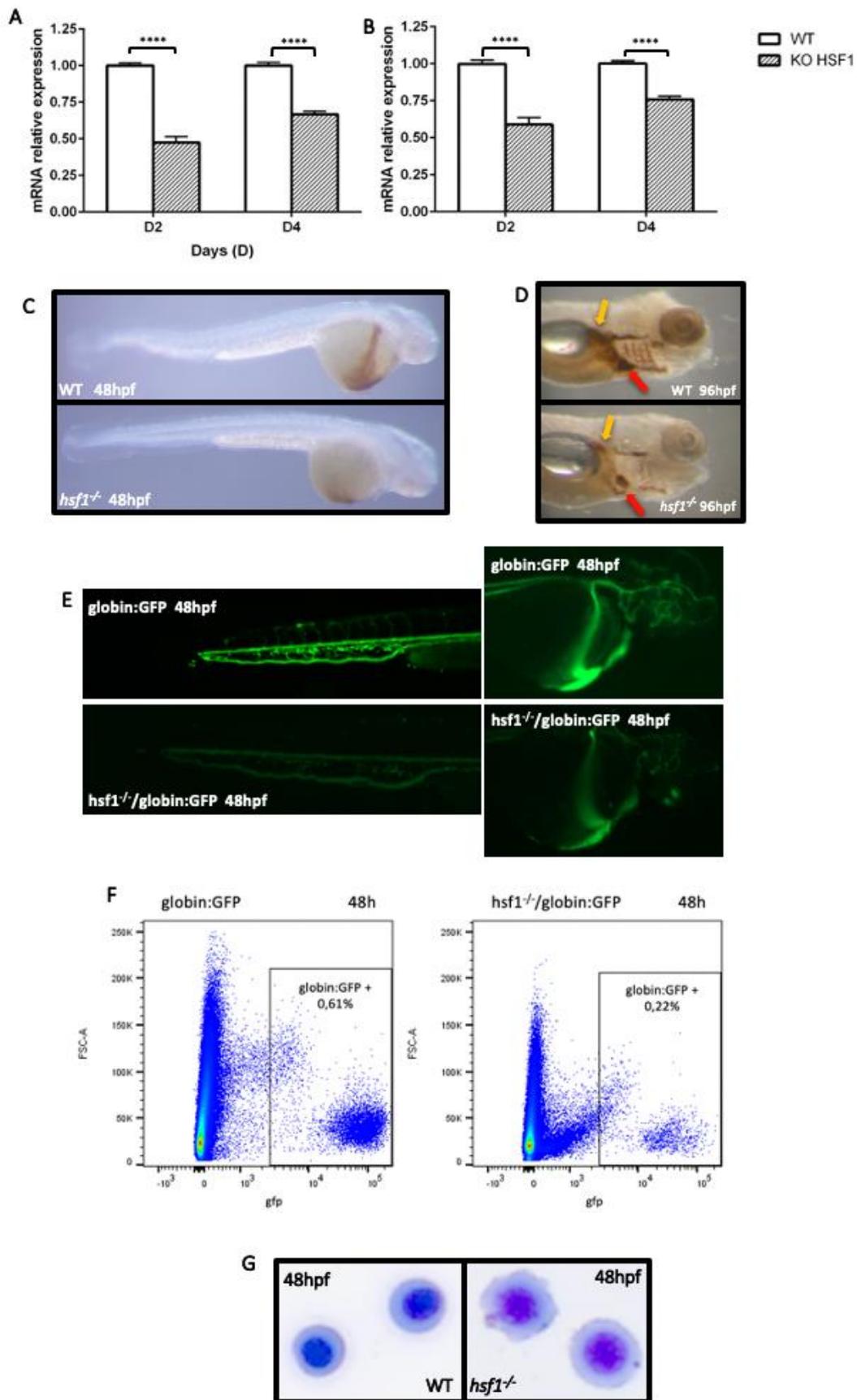


Figure 4

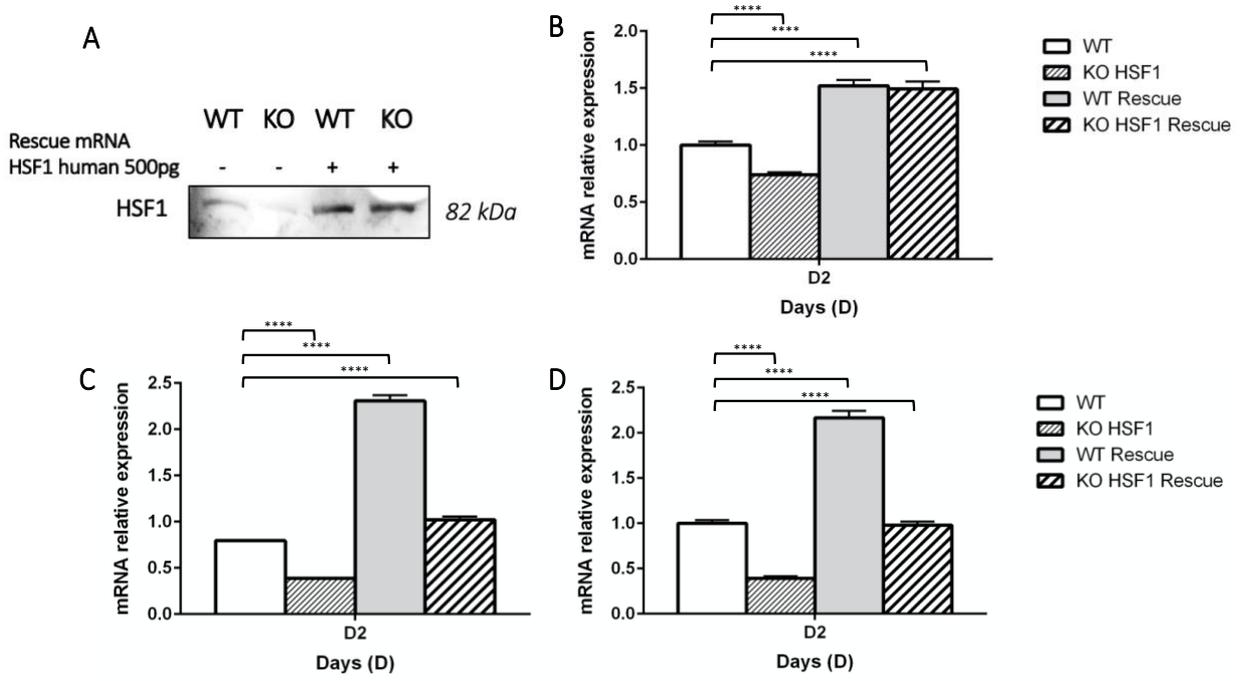


Figure 5

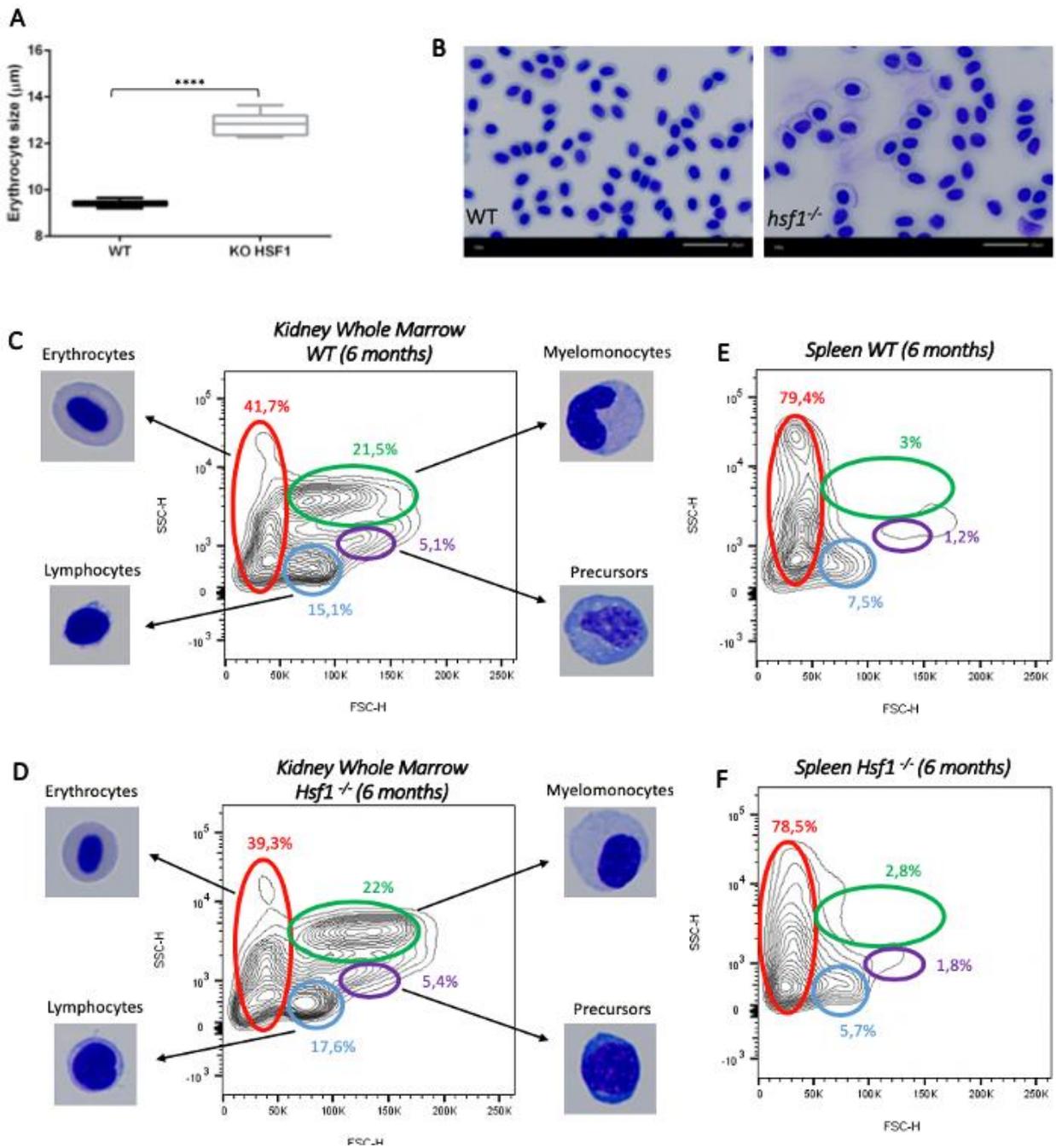


Figure 6

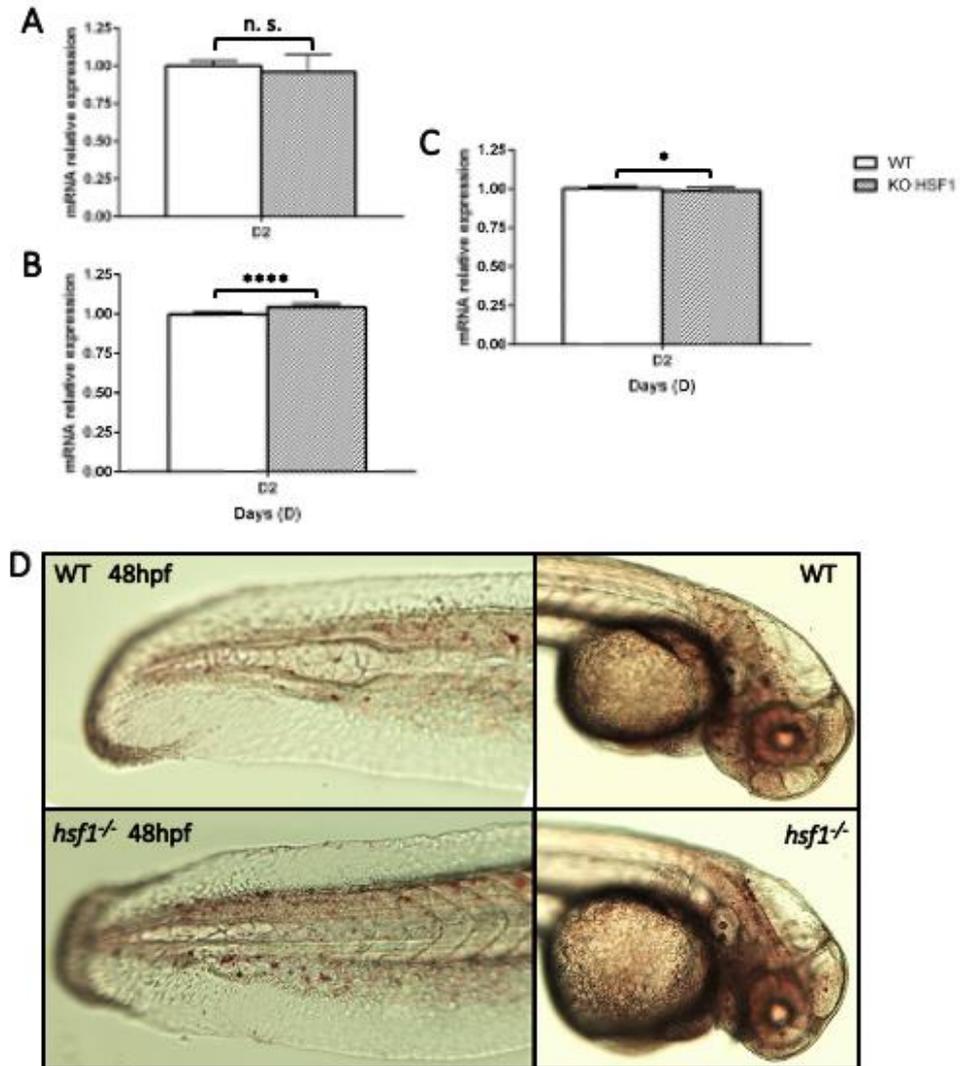


Table 1

	Percentage of cells (%)			
	Erythrocytes	Lymphocytes	Myelomonocytes	Precursors
Whole Kidney Marrow				
WT (6 months) n=3	41,7 ± 11,1	15,1 ± 2,1	21,5 ± 4,0	5,1 ± 1,2
KO HSF1 (6 months) n=3	39,3 ± 4,2	17,6 ± 4,4	22,0 ± 4,1	5,4 ± 2,6
Spleen				
WT (6 months) n=4	79,4 ± 5,2	7,5 ± 4,4	3,0 ± 0,9	1,2 ± 0,7
KO HSF1 (6 months) n=3	78,5 ± 5,8	5,7 ± 3,1	2,8 ± 1,9	1,8 ± 0,8

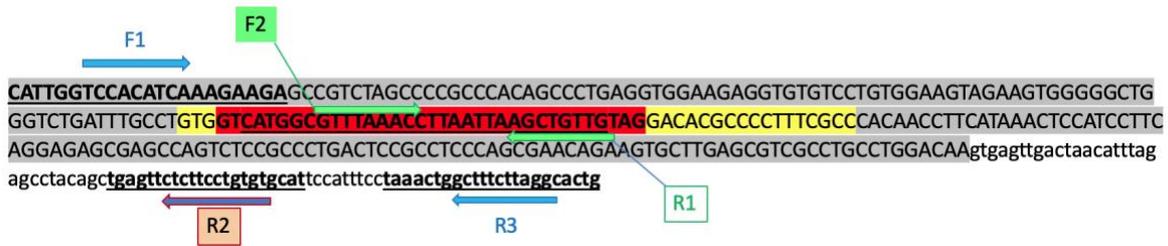
Supplemental materials

<u>sgRNA</u>	5' - 3'
SP6 promotor	ATTTAGGTGACACTATA
Target sequence of exon 9 of the <i>hsf1</i> gene	GGCGAAAGGGCGTGTCCAC
Sequence that hybridizes to the constant oligo	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
Constant oligonucleotide	AAAAAGCACCGACTCACCGACTCGGTGCCACTTTTT TTTTCAAGTTTTGATAACGGACTAGCCTATTTAACT TGCTTTCTAGCTCTAAAAAC
<u>Oligonucleotide cassette</u>	5' - 3'
Sequence homologous to the target sequence of the <i>hsf1</i> gene upstream of the Cas9 cleavage point	CTGGGTCTGATTTGCCTGTG
Cassette with three stop codons	GTCATGGCGTTTAAACCTAATTAAGCTGTTGTAG
Sequence homologous to the target sequence of the <i>hsf1</i> gene downstream of the Cas9 cleavage point	GACACGCCCTTTTCGCCAC

S1 Table 1. Oligonucleotides for the synthesis of the sgRNA and the stop codon cassette for the invalidation of *hsf1* gene by the CRISPR/CAS9 technique

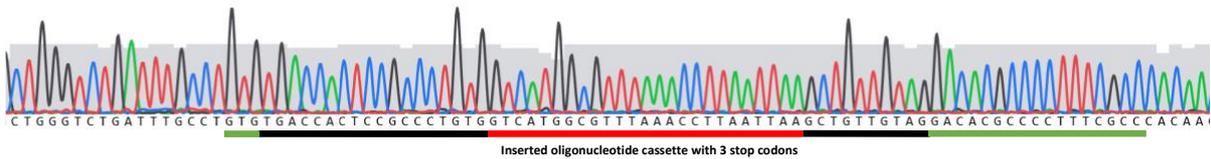
<u>Primer</u>	5' - 3'
F1	CATTGGTCCACATCAAAGAAGA
F2	atgcacacaggaagagaactca
R1	CAACAGCTTAATTAAGGTTTAAACGCCATG
R2	CATGGCGTTTAAACCTAATTAAGCTGTTG
R3	cagtgccctaagaaagccagtta

S1 Table 2. Primers for the validation of the correct insertion of the stop codon cassette into the zebrafish genome of generations F0, F1, F2



S1 Figure 1. Exon 9 organization of the *hsf1* gene with oligonucleotide et primer target sites

Lower case letters = intron post-exon 9, Upper case letters = Exon 9, Grey highlighting = Exon 9, Yellow highlighting = target sequence of exon 9, Red highlighting = oligonucleotide cassette containing the 3 stop codons; F1, F2, R1, R2 and R3 = location of the primers to validate the correct insertion of the oligonucleotide cassette into the zebrafish genome



S1 Figure 2 Sequence of the region around exon 9 of *hsf1* after insertion of an oligonucleotide cassette by CRISPR/Cas9 from homozygous *hsf1*^{-/-} F2 zebrafish

Red line = inserted oligonucleotide cassette with the 3 stop codons, black line = base pairs inserted after recombination, green line = target sequence of *hsf1* gene (GGCGAAAGGGCGTGTCTC Ψ CAC or complementary strand GTG Ψ GACACAGCCCCTTTCGCC with Ψ = cut-off site of the Case9)

Gene	Forward 5'– 3'	Reverse 5'– 3'
<i>hprt1b</i>	CAGCGATGAGGAGCAAGGTATTG	GTCCATGATGAGCCCGTGAGG
<i>gata1</i>	AAGATGGGACAGGCCACTAC	TGCTGACAATCAGCCTCTTTT
<i>hsp70</i>	CAACAACCTGCTGGGCAAA	GCGTCGATGTCGAAGGTCA
<i>hbae1</i>	CAGTGAGCTCCATGCTTTCCA	CGAGGATGTTGTGGGACAGAA
<i>hbbe1</i>	GCTTGACCATCGTTGTTGC	TGAATTTCTGGAAAGCGGCC
<i>spi1</i>	GGGCAGTTTTAACCAAGATCA	CCCAAGAGTGATCGTTCTGAC
<i>mpo</i>	GGGGCAGAAGAAGAAAGTCC	CCCTTGCTAAACTCTCATCTCG
<i>lcp1</i>	TAGCGGGTTGAAGATGGCAG	CAGAGCGATCAGAGCTTCGT

S2 Table 1. Primers for RT-qPCR

A HSF1 Human Isoforme X1 → 496aa
MDLPVGPAAAGPSNV **PAFLTKLWTLVSDPDTDALICWSPSGNSFHVFDQGQFAKEVLPKYFKHNNMASFVRQLNMYG**
FRKVVHIEQGGLVKPERDDTEFQHPCFLRGQEQLLENIKRKV TSVSTLKSEDIKIRQDS **VTKLLTDVQLMKGKQECM**
DSKLLAMKHENEALWREVASLRQKHAQQQKVVNKLIOFLISLVQSNRILGVKRKIPL MLNDSGSAHSMPKYSRQFSL
EHVHGSGPYSAFSSSSLYAPDAVASSGPIISDITELAPASPMASPGGSIDERPLSSSPLVRVKEEPPSPQSP
RVEEASPRPSSVDTLLSPTALIDSILRESEPAFASVTALTDARGHTDTEGRPPSPPTSTPEKCLSVACLDNLART
PQMSRVARLFPSPSSPHGQVQPGN **ELSDHLDAMDSNLDNLQTMLSSHGFSVDTSAALLDIQ** ELLSPQEPPRPEAEN
SSPDSAGALHSAAAVPAGPRLRGHREQRPAHAV

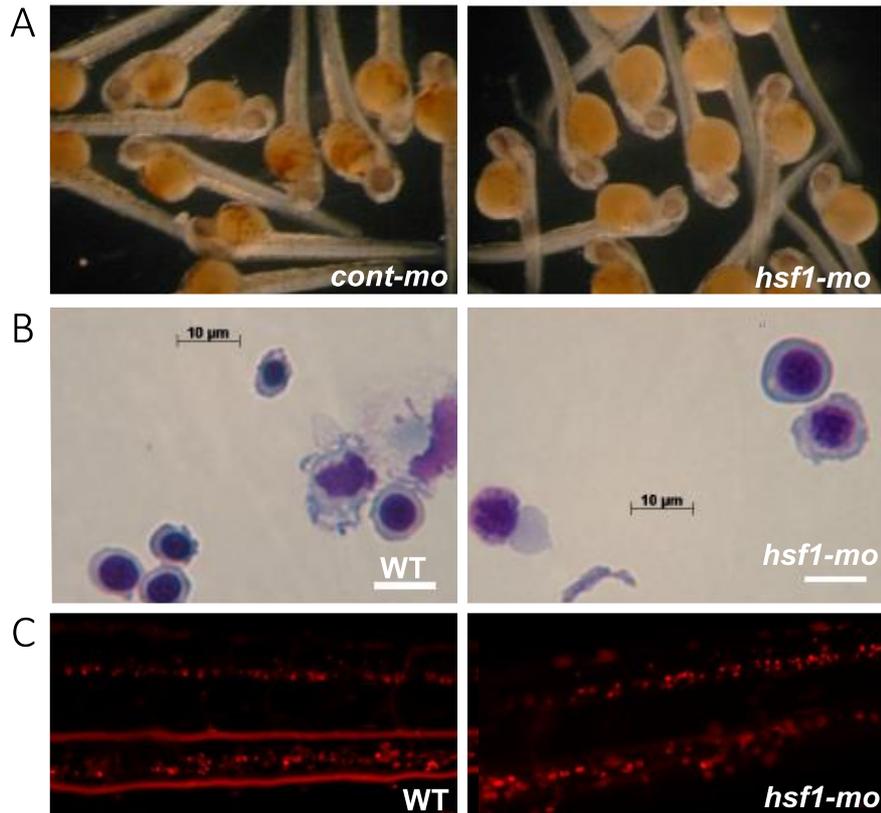
B HSF1a Zebrafish → 497aa
MEYHSVGPGGVVVTGNV **PAFLTKLWTLVEDPDTPLICWSPNGTSFHVFDQGRFSKEVLPKYFKHNNMASFVRQLN**
MYGFRKVVHIEQGGLVKPEKDDTEFQHPYFIRGQEQLLENIKRKV TTVSNIKHEDYKFSTDD **VSKMISDVQHMKGKQ**
ESMDSKISTLKHENEMLWREVATLRQKHSQQQKVVNKLIOFLITLARSNRVLGVKRKMPL MLNDSGSAHSMKFSRQ
YLSLSPAPSSSTAFTGTGVFSSSPVKTGPIISDITELAQSSPVATDEWIEDRTSPLVHIKEEPPSPAHSPEVEEVCV
VEVEVGAGSGLPVDTPLSPTTFINSILQESEPVASLTPPSEQKCLSVACLDKT **ELHDHLESIDSGLENLQQIILNAQ**
SINFDSPLFDI SSAASDVLDLSLAIQDQLSDPDKETESGVDTDSGKQLVQYTSQPVLDPDLSTDSSTDLPM
LLELQDDSYFSSSEPTEDPTIALLNFPVPEDPKLS

C

HSF1 human	13	SNV PAFLTKLWTLVSDPDTDALICWSPSGNSFHVFDQGQFAKEVLPKYFKHNNMASFVRQ	72
Hsf1 zebrafish	16	+NV PAFLTKLWTLV DPDTD LICWSP+G SFHVFDQG+F+KEVLPKYFKHNNMASFVRQ	75
HSF1 human	73	LNMYGFRKVVHIEQGGLVKPERDDTEFQHPCFLRGQEQLLENIKRKV TSVSTLKSEDIKI	132
Hsf1 zebrafish	76	LNMYGFRKVVHIEQGGLVKPEKDDTEFQHPYFIRGQEQLLENIKRKV TTVSNIKHEDYKF	135
HSF1 human	133	RQDSVTKLLTDVQLMKGKQECMDSKLLAMKHENEALWREVASLRQKHAQQQKVVNKLIOF	192
Hsf1 zebrafish	136	STDDVSKMISDVQHMKGKQESMDSKISTLKHENEMLWREVATLRQKHSQQQKVVNKLIOF	195
HSF1 human	193	LISLVQSNRILGVKRKIPL MLNDSGSAHSMPKYSRQFSL EHVHGSGPYSAFSS---AYSS	249
Hsf1 zebrafish	196	LITLARSNRVLGVKRKMPL MLNDSGSAHSMKFSRQYSLE-----SPAPSSSTAFTG	246
HSF1 human	250	SSLYAPDAVASSGPIISDITELAPASPMASPGGSIDERPLSSSPLVRVKEEPPSPQSPR	309
Hsf1 zebrafish	247	TGVFSSSPVKTGPIISDITELAQSSPVATDEW-IEDR---TSPLVHIKEEPPSPAHSPE	302
HSF1 human	310	VEEAS--- -----PGRPSSVDTLLSPTALIDSILRESEPAFASVTALTDARGHTDTEGRPP	362
Hsf1 zebrafish	303	VEEVC PVEVEVGAGSGLPVDTPLSPTTFINSILQESEP-----VSALT-----	345
HSF1 human	363	SPPPTSTPEKCLSVACLDNLARTPQMSRVARLFPSPSSPHGQVQPGNELSDHLDAMDSN	422
Hsf1 zebrafish	346	PPP+ +KCLSVACLD ----- EL DHL+++DS	374
HSF1 human	423	LDNLQTMLSSHGFSVDTSAALLDI	445
Hsf1 zebrafish	375	LENLQQIILNAQSINFDSPLFDI	397

S3 Figure 1. Alignment of the amino acid sequences of HSF1 human and Hsf1 zebrafish

(A) Amino acid sequence of human HSF1. (B) Amino acid sequences of zebrafish Hsf1. (C) Alignment of the amino acid sequences of human and zebrafish HSF1 with BLAST®. The identical amino acids are shown in black and similar amino acids are presented in gray color. The three domain structures: DNA binding domain (DBD) in green, hydrophobic heptad HRA/B red and hydrophobic heptad HRC orange. The Blue line indicates the CAS9 cleavage point.



S4 Figure 1. Knock-down by a *hsf1* morpholino leads to anemia.

(A) Whole-mount *o*-dianisidine staining of control-mo and *hsf1*-mo embryos at 48 hpf, showing less blood cells in *hsf1*-mo embryos in comparison to control-mo injected embryos taken with an Axio zoom microscope. This phenotype was observed in 100% of embryos injected with 250 M *hsf1*-mo (n=38) compared to control-mo (n=36). (B) May-Grünwald Giemsa staining of circulating red cells collected at 72 hpf. The erythrocytes of *hsf1* morphants present an immature shape in comparison to cont-mo injected embryos. Scale bar; 10mm (100X magnification). (C) Image of representative *Tg(gata1a:Dsred)* embryos injected with 250 mM *hsf1*-mo or cont-mo taken with an Axio zoom Macroscope. Erythrocytes were dispersed in the trunk of the *hsf1* morphants (8/8) and only few cells were observed in the caudal aorta and vein at 72 hpf, while all cont-mo had a normal circulation (6/6).

Supplemental materials and methods

Microinjection of morpholinos. Gene knock-down experiments were performed using morpholino-modified antisense oligonucleotides (mo; GeneTools, LLC; Philomath OR, USA). For the *hsf1*-mo we used the following sequence: 5'-CACGGAGAGTTTAGTGATGATTTCT-3'^{1,2,3,4}. As control we injected the standard nonsense morpholino from GeneTools: 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3' (cont-mo). The morpholinos were injected into the yolk of one to two cell stage embryos at 250 or 500 µM. The embryos were raised in constant dark up to 48-72 hpf at 28°C.

Histology. For blood analysis and o-diasidine staining, zebrafish embryos were anesthetized in water containing 0.02% tricaine (Sigma-Aldrich). After tail clipping using surgical scissors, blood cells were collected by pipetting and spun onto slides by centrifugation at 450 rpm for 3 min using a Cytospin 4 (Thermo, Shandon). The slides were then air-dried and subjected to May-Grünwald Giemsa (MGG) staining according to the standard protocol. Histochemical staining of hemoglobin by o-dianisidine (Sigma) was performed as described⁵.

Supplemental References

1. Wang G, Huang H, Dai R, Lee KY, Lin S, Mivechi NF. Suppression of heat shock transcription factor HSF1 in zebrafish causes heat-induced apoptosis. *Genesis*. 2001;30(3):195-197.
2. Evans TG, Belak Z, Ovsenek N, Krone PH. Heat shock factor 1 is required for constitutive Hsp70 expression and normal lens development in embryonic zebrafish. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2007;146(1):131-40.
3. Tucker NR, Middleton RC, Le QP, Shelden EA. HSF1 is essential for the resistance of zebrafish eye and brain tissues to hypoxia/reperfusion injury. *PLoS One*. 2011;6(7):e22268.
4. Etard C, Armant O, Roostalu U, Gourain V, Ferg M, Strahle U. Loss of function of myosin chaperones triggers Hsf1-mediated transcriptional response in skeletal muscle cells. *Genome Biol*. 2015;16:267.
5. Lieschke GJ, Oates AC, Crowhurst MO, Ward AC, Layton JE. Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood*. 2001;98(10):3087-3096.

Annexe 3 :

Étude des anomalies génétiques des érythrocytoses inexplicées – GenRED (*ANR-15-CE17-0021*)

COORDINATEUR DU PROJET

Monsieur François Girodon (Centre Hospitalier Universitaire de Dijon)

PARTENAIRE

INSERM Grand Est Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

INSERM Grand Ouest Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

CHU de Nantes Centre Hospitalier Universitaire de Nantes

EPHE ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

CHU de Dijon Centre Hospitalier Universitaire de Dijon

Introduction

Une érythrocytose résulte d'une érythropoïèse excessive et pathologique. Celle-ci est définie selon l'Organisation Mondiale de la Santé par l'augmentation du volume globulaire totale (>125% de la valeur normale théorique rapportée à la surface corporelle).

L'érythrocytose est caractérisée à la numération sanguine par l'augmentation des valeurs de l'hémoglobine circulante (>18,5g/dl chez l'homme et 16,5g/dl chez la femme après 15 ans) et de l'hématocrite. Elle peut être primitive comme c'est le cas pour la maladie de Vaquez, ou secondaire à de nombreuses causes responsables d'une hypoxie chronique (maladies cardiovasculaires et/ou respiratoires chroniques) (McMullin, 2009). Dans ces circonstances, les modalités de prise en charge thérapeutique sont bien identifiées et validées. En revanche, dans un certain nombre de cas, il n'existe aucune explication à l'existence de l'érythrocytose qui est dès lors appelée « idiopathique ».

Depuis quelques années, ces érythrocytoses idiopathiques ont fait l'objet d'études qui ont permis de mettre en évidence diverses anomalies. Elles peuvent être en particulier liées soit à la présence d'une hémoglobine anormale (de type hémoglobine hyperaffine pour l'oxygène qui relargue difficilement l'oxygène aux tissus), soit à une anomalie des voies de l'hypoxie.

L'érythropoïétine (EPO) est le principal facteur de stimulation de l'érythropoïèse, et est sous la dépendance stricte et fine de la régulation de l'hypoxie tissulaire, en particulier rénale. L'hypoxie désigne une diminution de la quantité d'oxygène apportée aux organes par le sang. Elle est une conséquence de l'hypoxémie qui est la diminution de la quantité d'oxygène transportée par les globules rouges dans le sang. L'acteur majeur de l'adaptation à la diminution de la concentration en O₂ est le facteur de transcription Hypoxia Inducible Factor (HIF) : un complexe hétérodimérique possédant une sous-unité alpha régulée en fonction de la concentration en oxygène et une sous-unité bêta exprimée de façon constitutive. La sous-unité alpha (HIF1 α , HIF2 α , ou HIF3 α) est principalement régulée par des modifications post-traductionnelles et notamment par l'hypoxie (Gregg, 2000).

En présence d'O₂, les molécules de HIF formées sont rapidement dégradées par le protéasome via l'action interconnectée des protéines prolyl hydroxylases (PHD) et la protéine suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau (VHL) (Kaelin et *al*, 2008). La dégradation de HIF est rendue possible par une hydroxylation enzymatique via les dioxygénases PHD 1, 2 ou 3. Le résidu 4-hydroxyproline est alors reconnu par la protéine VHL qui est la sous-unité de reconnaissance du substrat (ici, HIF α) d'un complexe ubiquitine ligase E3, de sorte que cette capture entraîne l'ubiquitination et la destruction finale de HIF α (Hodges et *al*, 2007).

En condition d'hypoxie, ce processus est interrompu car le manque d'oxygène limite l'action des PHD (McMullin, 2009). HIF α est ainsi stabilisée, capable de transloquer dans le noyau et de former un complexe transcriptionnel actif avec HIF β et CBP/p300, induisant la transcription de gènes qui possèdent une séquence consensus « Hypoxia Responsive Element » (HRE), comme l'EPO (Wenger et al, 2005 ; Wenger et al, 2010).

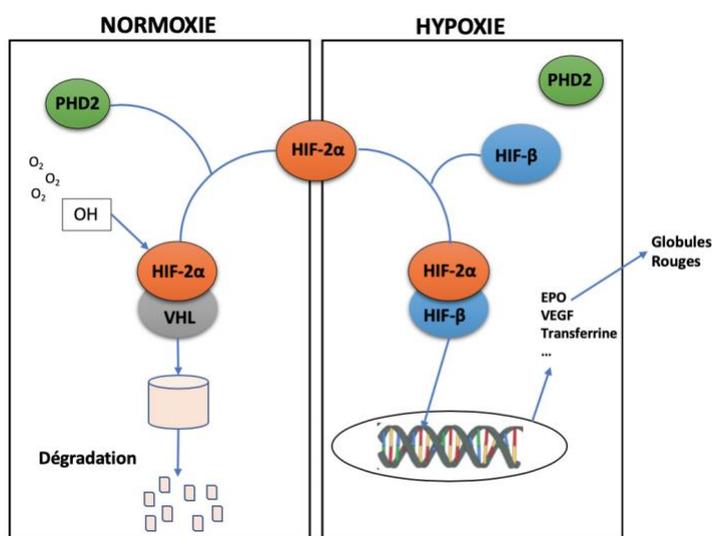


Figure 1 Régulation de HIF dans l'hypoxie d'après McMullin (2009)

Ainsi, une mutation d'un gène codant une protéine impliquée dans la régulation de la voie de l'hypoxie pourra entraîner le développement d'une érythrocytose idiopathique (McMullin, 2009) via une surexpression d'EPO. A ce jour, des mutations dans trois gènes principaux de la voie de régulation de l'hypoxie ont été identifiés chez des patients atteints d'érythrocytose héréditaire.

La première mutation découverte dans la voie de régulation de l'hypoxie a été dans le gène VHL (Ang et al, 2002). Un grand nombre de personnes habitant dans la région de Chuvash en Russie présentant une érythrocytose a été diagnostiqué avec une mutation germinale dans le gène VHL à l'état homozygote. Il s'agit de la mutation C598T conduisant à un changement d'acide aminée Arg200Trp (Bond et al, 2011). D'autres mutations VHL à l'état hétérozygote, homozygote ou hétérozygote composite ont été identifiées chez des patients avec une érythrocytose héréditaire (Sable et al, 2012 ; Gordeuk et al, 2004).

Plus récemment, des mutations germinales du gène EGLN1 codant la protéine PHD2 sont retrouvées à l'état hétérozygote et sont de type « perte de fonction ». L'étude fonctionnelle (Percy et al, 2006) de ces mutants a mis en évidence un défaut de fixation des PHD2 mutées à HIF et une diminution de leur activité hydroxylase (Ladroue et al, 2012) : cela se traduit par une moindre efficacité de l'enzyme PHD2,

une moindre dégradation de HIF2 α , une augmentation de la production d'EPO et, au niveau phénotypique, une érythrocytose.

Enfin, des mutations germinales faux-sens à l'état hétérozygote de type « gain de fonction » ont été identifiées sur le gène EPAS1. Son expression entraîne la synthèse de HIF2 α . Les études fonctionnelles (Percy et *al*, 2008) ont mis en évidence que les protéines HIF2 α mutées se lient plus faiblement à PHD2. HIF2 α mutée est donc moins hydroxylée et se fixe moins efficacement à VHL ce qui entraîne sa stabilisation. Elle est capable de fixer HIF1 β dans le noyau. Le facteur de transcription HIF actif augmente alors considérablement la transcription de gènes qui possèdent une séquence consensus HRE comme l'EPO. Les patients ayant une mutation du gène EPAS1/ HIF2 α vont présenter une érythrocytose associée à une forte concentration d'EPO (Furlow et *al*, 2009).

Néanmoins, et bien que l'ensemble de ces découvertes ait constitué une formidable avancée dans la compréhension de la physiopathologie de ces érythrocytoses, elles n'ont permis d'expliquer à peine que 20% des cas. Ainsi, il existe toujours un groupe de patients polyglobuliques chez lesquels aucune cause n'a été identifiée à ce jour (Bento et *al*, 2014). Le séquençage du génome de ces patients a révélé la possible implication de nouvelles mutations qui nécessitent la confirmation de leur rôle dans la genèse des érythrocytoses grâce à des tests approfondis sur des modèles animaux.

Le poisson zèbre (*Danio rerio* = Zebrafish) est un vertébré présentant de nombreux avantages qui lui permettent d'être un modèle de choix : en effet, il possède environ 26000 gènes codants, dispersés sur 25 chromosomes, dont environ 70% de gènes ont au moins un orthologue humain (Howe et *al*, 2013). Son programme génétique est donc proche de celui de l'Homme, ce qui explique son utilisation dans de nombreux domaines tels que la génomique, l'hématopoïèse et la modélisation de pathologies humaines. Le poisson zèbre a un développement très rapide : l'embryogénèse dure 24 heures et l'organogénèse est entièrement achevée après 5 jours de développement. Son élevage est aisé et économique. De plus, le développement des embryons ex-vivo et la transparence des œufs et des larves, favorisent la manipulation des embryons, mais surtout la visualisation de la formation et de la fonction des organes internes dans un organisme vivant et ainsi d'éventuels défauts phénotypiques. Ceci permet également une observation plus facile avec l'utilisation de gènes rapporteurs ou de marqueurs fluorescents. L'hématopoïèse chez le poisson zèbre au cours du développement embryonnaire se fait par vagues successives au niveau de différents organes. Le site définitif de l'hématopoïèse, équivalent de la moelle osseuse chez les mammifères est le rein où des cellules souches hématopoïétiques sont retrouvées entre les tubules rénaux. Les cellules sanguines définitives

sont composées d'érythrocytes, de granulocytes, de monocytes, de lymphocytes et de thrombocytes (Carradice & Lieschke, 2008).

La majorité des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation hématopoïétique chez les mammifères ont des orthologues chez le poisson zèbre (Amsterdam *et al*, 2005) laissant supposer une conservation des mécanismes de régulation de cette différenciation. Comme les globules rouges sont les premières cellules à apparaître dans le sang au cours de l'embryogenèse, l'étude de l'érythropoïèse fournit un point d'entrée important dans la biologie du développement et la formation du sang ou hématopoïèse. En outre, l'analyse des mécanismes par lesquels les protéines, telles que les globines, sont fortement et spécifiquement exprimées durant le développement des cellules érythroïdes a servi de modèle pour la régulation transcriptionnelle chez les eucaryotes supérieurs.

Par conséquent, l'utilisation du poisson zèbre constitue un modèle privilégié dans l'étude de l'érythropoïèse, susceptible d'ouvrir de nouvelles voies dans la compréhension des mécanismes de régulation de l'hématopoïèse et par conséquent de proposer de nouvelles approches thérapeutiques. De plus, la voie de régulation de l'hypoxie est très conservée chez le poisson zèbre et ce modèle *in vivo* a déjà été validé pour l'étude des érythrocytoses : l'inactivation de *vhl* entraîne le développement d'une production excessive de globules rouges chez le poisson zèbre qui mime la polyglobulie de Chuvash développée chez les patients porteurs de la mutation VHL-R200W (van Rooijen *et al*, 2007).

Contexte de l'étude

Actuellement, une étude multicentrique impliquant notamment les CHU de Nantes et de Dijon, en partenariat avec des centres de recherche associés, est en cours, dont l'objectif est de rechercher de nouveaux bio-marqueurs diagnostiques pour les 80% d'érythrocytoses inexplicables, afin de permettre une meilleure prise en charge thérapeutique. Ainsi, un séquençage de nouvelle génération (NGS) de gènes candidats sera complété à Nantes par une analyse de l'exome (partie du génome constituée par les exons, c'est-à-dire les parties des gènes codants les protéines) pour les patients sans anomalie détectée, afin de mettre en évidence de nouvelles mutations qui, une fois identifiées, seront testées *in vitro* à Nantes et secondairement *in vivo* à Dijon dans des modèles de poisson zèbre.

Ce travail correspond au 5ème groupe de travail de cette étude (WP5), groupe qui valide les résultats scientifiques des étapes précédentes.

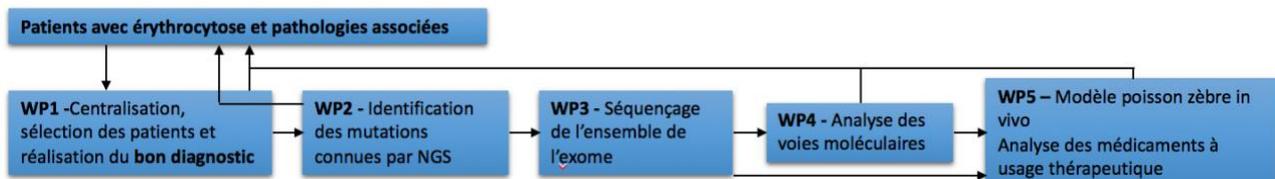


Figure 2 Organisation de l'étude multicentrique des érythrocytoses idiopathiques

A ce jour, 5 mutations du gènes *EPAS1A* (*HIF2A*) : *HIF2A* Q557H, *HIF2A* A530S, *HIF2A* D525G, *HIF2A* D493G, et *HIF2A* F374Y ont été mis en évidence chez les patients porteurs d'une érythrocytose idiopathique.

Le but du projet est de valider *in vivo* chez le poisson zèbre les mutants afin de déterminer si ces mutations jouent un rôle dans l'apparition d'une érythrocytose idiopathique. Pour cela, deux approches ont été entreprises :

(i) une approche à court terme ayant pour but de surexprimer transitoirement les protéines d'intérêt dans les embryons et d'observer un éventuel phénotype d'érythrocytose

(ii) une approche à long terme qui aura pour objectif de créer des lignés transgéniques stables exprimant ces mêmes protéines en fluorescence.

Résultats

Nous avons décidé de réaliser un knock-down et un knock-out du gène *epas1a* du poisson zèbre. Une fois le knock-down du gène *epas1a* réalisé, un sauvetage a été réalisé avec l'ARN *epas1a* WT et muté du poisson zèbre et avec l'ARN *HIF2A* WT et muté humain.

Le but est toujours de mettre en évidence une relation entre la présence d'une érythrocytose et les mutations humaines identifiées chez ces mêmes patients porteurs d'une érythrocytose.

I. Knock-down *epas1a*

I.1 Synthèse et validation des morpholinos *epas1a*

Pour obtenir une « perte de fonction » du gène *epas1a* du poisson zèbre, nous avons cherché à réaliser un knock-down de notre gène d'intérêt via l'injection d'un morpholino (MO).

Le knock-down peut être réalisé soit :

- En bloquant la traduction en ciblant le site d'initiation de la traduction de la protéine du poisson zèbre ou à proximité,

- En interférant avec l'épissage en plaçant un MO sur une jonction d'épissage, induisant l'inclusion d'un intron ou un saut d'exon.

Nous avons désigné 2 morpholinos :

- MO n°1 : TGTGTTATCTTTTGTTCAGGCCAT sur l'exon 3 du gène *epas1a* du poisson zèbre
- MO n°2 : TTCAGCCTCTTCTGTTTTGCAGGCA sur l'exon 2 du gène *epas1a* du poisson zèbre

Suite à la publication de C. Gerri et *al.*, en janvier 2018, nous avons également fait synthétiser le morpholino décrit afin de réaliser un knock-down du gène *epas1a* : GCAGGACAAGGTTCTTCAGCATCAT sur l'exon 1 contenant l'ATG.

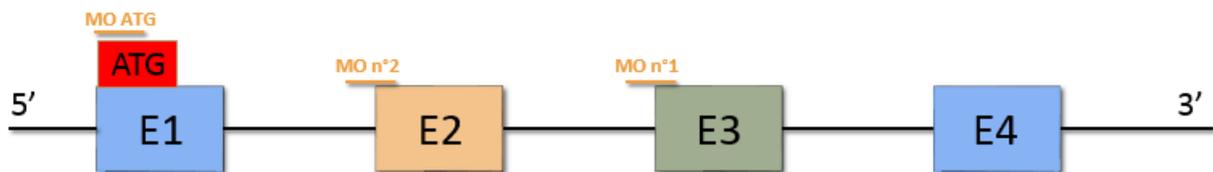


Figure 3 Schéma d'une partie du gène *epas1a* (trait noir = intron, carré = exon (E))

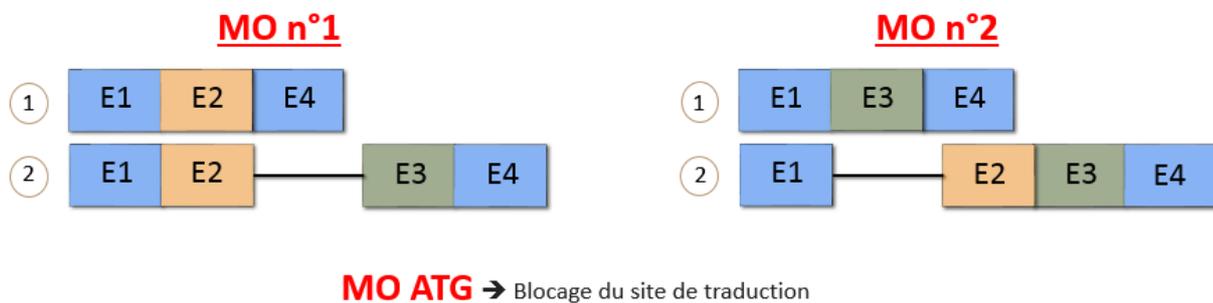


Figure 4 Épissage attendu du gène *epas1a* après injection des MO (1 = saut d'exon et 2 = inclusion d'un intron)

Après injection de nos MO, nous avons effectué une PCR pour confirmer l'efficacité du MO n°1 et n°2.

Nous avons donc désigné une paire d'amorce avec :

- Le primer forward (F) sur l'exon 1 du gène *epas1a* (5' CAGCCGAGAGAGAGAAAAAG 3')
- Le primer reverse (R) sur l'exon 6 du gène *epas1a* (5' TGGCGGCTCTGAAAACCCAC 3')

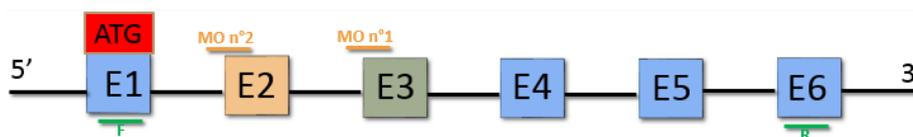


Figure 5 Schéma d'une partie du gène *epas1a* avec les primers F et R

Dans les embryons non-injectés (NI), l'ensemble des exons est normalement présent. Nous devons obtenir une amplification de 647 paires de bases (pb).

Dans les embryons injectés, l'épissage pourrait induire un saut d'exon et ainsi réduire la longueur de l'ADN avec une diminution de 152pb si nous avons un saut de l'exon 3 (MOn°1) ou une diminution de 152pb si nous avons un saut de l'exon 2 (MOn°2).

Nous devons donc observer une double amplification pour chacun des deux MO :

- MOn°1 : 647pb (taille normale) et 495pb
- MOn°2 : 647pb (taille normale) et 456pb

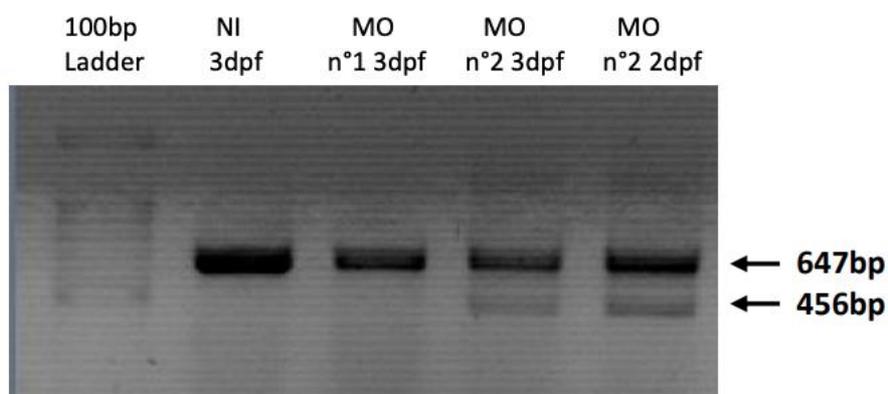


Figure 6 Résultat de PCR pour le MO n°1 et le MOn°2 à 2ng à 3dpf

Nous observons une seule amplification pour le MO n° 1 mais une double amplification pour le MOn°2 aux paires de base recherchées. Nous avons donc pu valider le MO n°2.

Pour les embryons injectés avec le MO n°1, notre MO a pu également entrainer un défaut de l'épissage en induisant l'inclusion d'un intron.

Nous avons désigné une nouvelle paire d'amorce avec :

- Le primer forward (F1) sur l'intron précédent l'exon 3 du gène *epas1a* (5' GTGCGCTCTGCCAGATGAAA 3')
- Le primer reverse (R1) sur l'exon 3 du gène *epas1a* (5' GGCCTAAATTTTGGCACC GC 3')

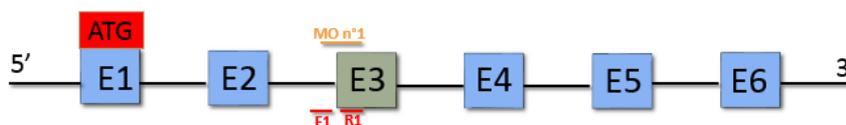


Figure 7 Schéma d'une partie du gène EPAS1a avec les primers F1 et R1

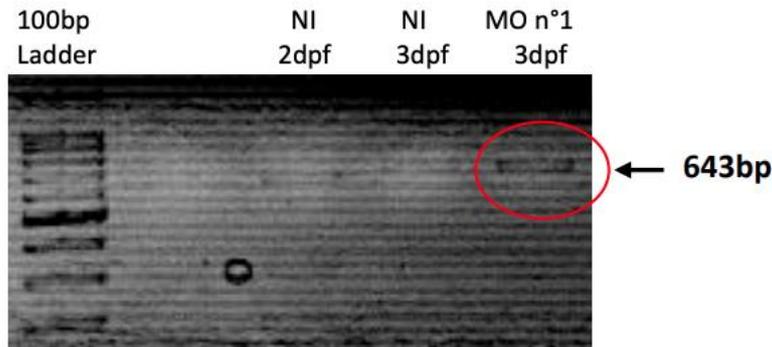


Figure 8 Résultat de PCR pour le MO n°1 à 2ng à 3dpf

Dans les embryons NI, l'épissage se déroule normalement et le primer F1 ne doit pas s'hybrider. Par conséquent, nous ne devons pas observer d'amplification ce qui est le cas.

Dans les embryons injectés avec le MO n°1, nous observons une amplification de 643 pb confirmant la présence de l'intron précédent l'exon 3. Nous avons donc pu valider le MO n°1.

1.2 Comptage des cellules circulantes

Nous avons réalisé un comptage des cellules circulantes à 2 et 3 jours après fertilisation (dpf) chez nos poissons zèbres injectés avec un des trois morpholinos.

Le comptage a été réalisé pour chaque morpholino sur 4 séries de 25 embryons injectés.

Nous avons 4 catégories pour mettre en évidence les différents phénotypes observés : pas de circulation, circulation de 1 cellule, circulation de 2 à 10 cellules et circulation normale.

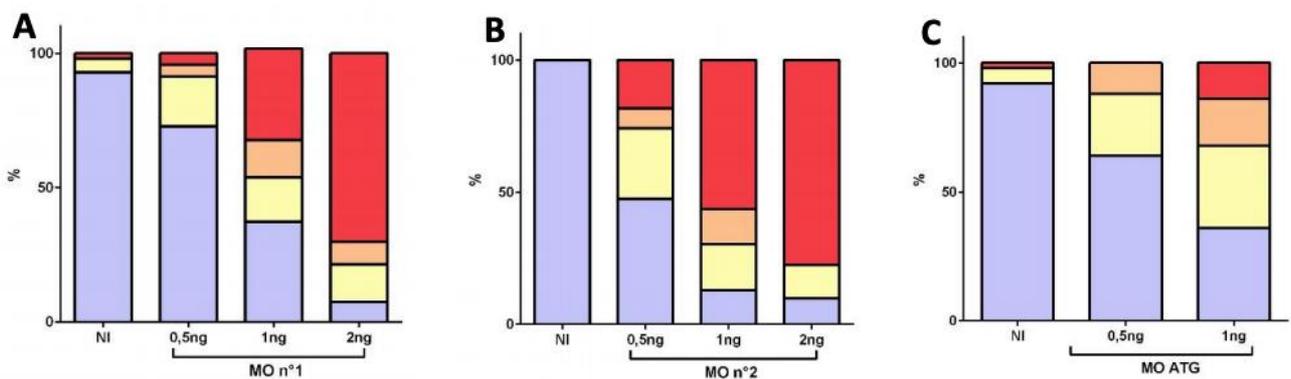


Figure 9 Comptage de la proportion de larves pour lesquelles la circulation est altérée à 3dpf des poissons zèbres injectés avec morpholino n°1 (A) et des poissons zèbres injectés avec morpholino n°2 (B) à 0.5, 1 et 2ng, Poissons zèbres injectés avec morpholino ATG (C) à 0.5 et 1ng.

Légende : Pas de circulation (rouge), circulation de 1 cellule (orange), circulation de 2 à 10 cellules (jaune) et circulation normale (bleu)

Nous avons pu observer une diminution du nombre de cellules circulantes. De plus, plus la concentration en MO était élevée plus le nombre de cellules circulantes diminuait. Le morpholino n°2 semble plus efficace que le morpholino n°1 et le morpholino ATG.

I.3 Observation au microscope à fluorescence

Les observations du phénotype de nos embryons injectés avec le MO n°2, au microscope à fluorescence, confirme la diminution du nombre d'érythrocytes circulants. De plus, on observe un développement normal des vaisseaux chez nos embryons injectés.

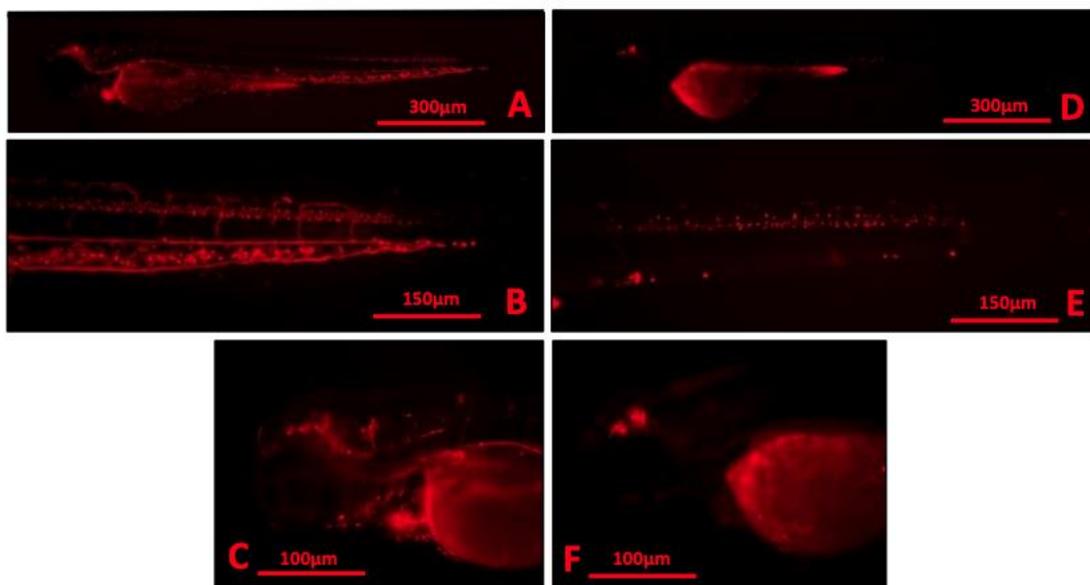


Figure 10 Vue latérale des larves transgéniques de *2dpf gata1-DsRed WT* (A, B et C) et injectés avec le *MO n°2 2ng* (D, E et F)

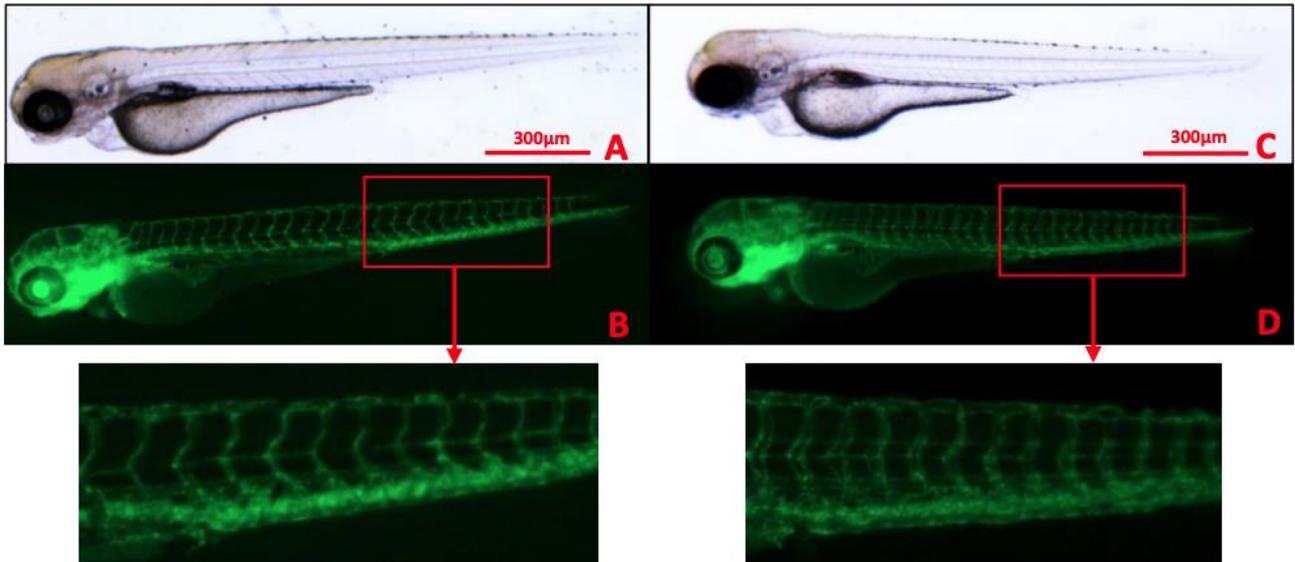


Figure 11 Vue latérale des larves transgéniques de 2dpf *fli-gata1-DsRed* WT (A et B) et injectés avec le MO n°2 2ng (C et D)

I.4 Cytométrie en flux

Pour confirmer les phénotypes observés, nous avons injectés chaque MO dans des poissons zèbre transgéniques *Tg(Gata1:DsRed)* ayant les érythrocytes fluorescents rouges. Un pool de 50 embryons injectés était constitué pour chaque passage en cytométrie.

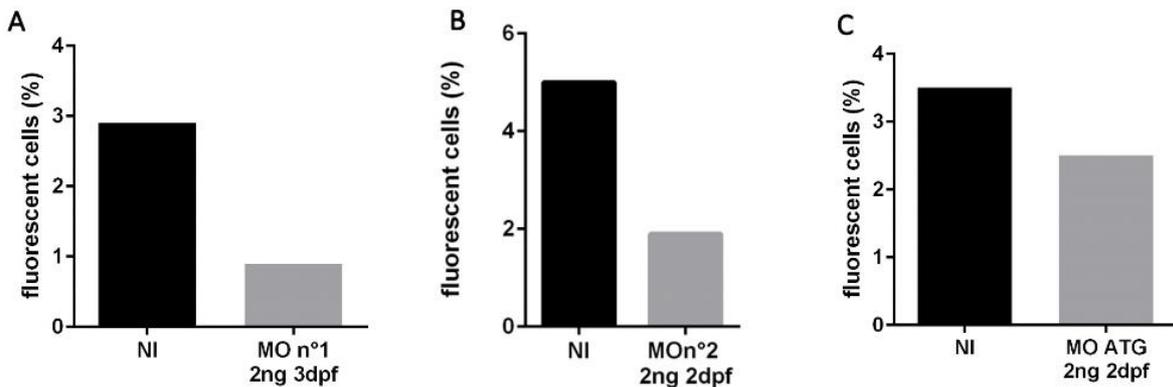


Figure 12 Cytométrie en flux à 2 et 3dpf des poissons zèbres injectés avec morpholino n°1 (A), des poissons zèbres injectés avec morpholino n°2 (B) et des poissons zèbres injectés avec morpholino ATG (C) à 2ng.

Nous avons observé une diminution du nombre de cellules fluorescentes rouges. Ces résultats confirment les résultats obtenus avec le comptage des cellules circulantes *via* observation du phénotype.

Par conséquent, suite à l'injection de nos trois MO, nous avons observé une anémie chez nos embryons *gata1:DsRed* injectés.

I.5 RT – qPCR

Nous avons évalué l'expression des gènes impliqués dans la voie de l'hypoxie par RT-qPCR. De nombreux gènes ont été testés mais les résultats les plus significatifs sont ceux obtenus avec *hbae1* et *hbbe3*.

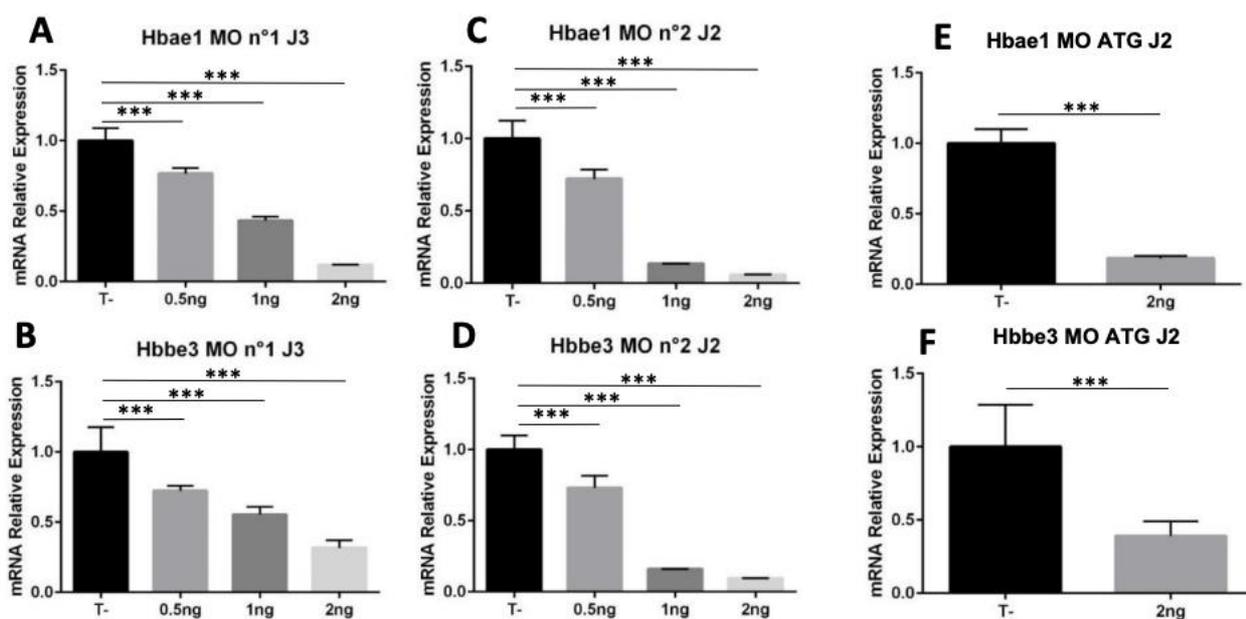


Figure 13 Résultat de RT-qPCR du gène *Hbae1* et *Hbbe3* à 2 et 3dpf des poissons zèbres injectés avec morpholino n°1 (A et B) et des poissons zèbres injectés avec morpholino n°2 (C et D) à 0.5,1 et 2ng, Poissons zèbres injectés avec morpholino ATG (E et F) à 0.5 et 1ng. *** : $P > 0,0001$

On a observé une diminution dose dépendante dans l'expression des gènes *Hbae1* et *Hbbe3* à 2 et 3dpf dans nos embryons injectés avec nos 3 MO : plus la concentration en MO était élevée et plus l'expression des gènes *Hbae1* et *Hbbe3* était faible.

Après validation de nos MO, nous avons décidé de travailler avec le MO n°2 à 1ng car il semble être le plus efficace pour knock-down le gène *epas1a*.

II. Sauvetage avec l'injection de l'ARNm *epas1a* du poisson zèbre et *HIF2A* humain

II.1 *epas1a* WT Poisson zèbre

Il y a 3 variants du gène *epas1a* chez le poisson zèbre, après analyse bioinformatique, nous avons fait le choix de travailler avec le variant X1 qui possède 73% d'identité avec le gène *HIF2A* humain.

Nous avons injecté le MO n°2 à 1ng et nous avons réalisé un sauvetage (rescue (R)) avec l'ARNm *epas1a* WT à 100pg et 250pg.

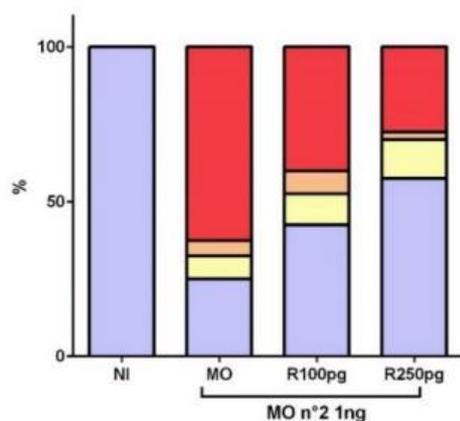
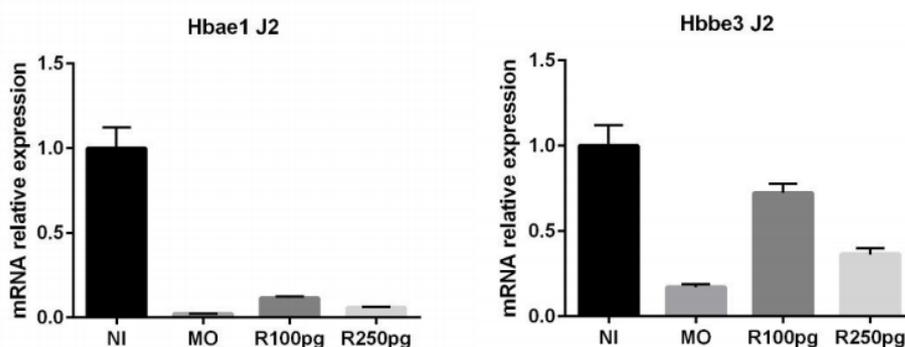


Figure 14 Comptage de la proportion de larves pour lesquelles la circulation est altérée à 2dpf des poissons zèbre injectés avec morpholino n°2 à 1ng et des poissons zèbres injectés avec morpholino n°2 à 1ng avec l'ARNm *epas1a* WT 100pg ou 250pg.

Légende : Pas de circulation (rouge), circulation de 1 cellule (orange), circulation de 2 à 10 cellules (jaune) et circulation normale (bleu)



MO n°2 1ng	-	+	+	+	-	+	+	+
ARN <i>epas1a</i>	-	-	+	-	-	-	+	-
WT 100pg	-	-	-	-	-	-	-	-
ARN <i>epas1a</i>	-	-	-	+	-	-	-	+
WT 250pg	-	-	-	-	-	-	-	-

Figure 15 Résultat de RT-qPCR du gène *hbae1* et *hbbe3* à 2dpf des poissons zèbres injectés avec morpholino n°2 à 1ng et des poissons zèbres injectés avec morpholino n°2 à 1ng avec l'ARNm *epas1a* WT 100pg ou 250pg.

II.2 HIF2A humain

Nous avons surexprimé le gène *HIF2A* humain pour confirmer que l'ARN humain injecté était bien traduit en protéine. Suite à la surexpression, nos Western-Blots ont été négatifs.

Nous avons donc modifié la séquence KOZAK du gène *HIF2A* humain pour augmenter les chances de traduction de notre ARN *HIF2A* humain injecté dans le poisson zèbre (Passage de ACCATGGC à AACATGGC).

Nous travaillons avec le gène *HIF2A* WT et le gène *HIF2A* muté sur les 2 prolines (P405A + P531A) avec la Kozak modifié (KM).

II.2.1 HIF2A WT Km humain

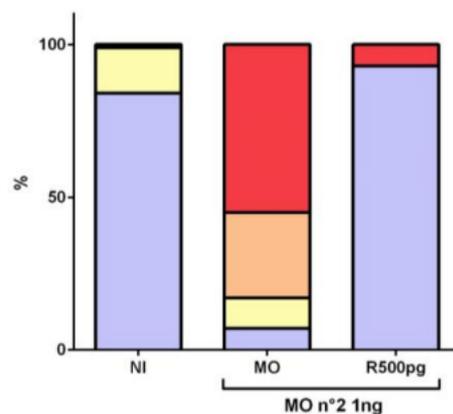


Figure 16 Comptage de la proportion de larves pour lesquelles la circulation est altérée à 2dpf des poissons zèbres injectés avec morpholino n°2 à 1ng et des poissons zèbres injectés avec morpholino n°2 à 1ng avec l'ARN *HIF2a* WT Km 500pg.

Légende : Pas de circulation (rouge), circulation de 1 cellule (orange), circulation de 2 à 10 cellules (jaune) et circulation normale (bleu)

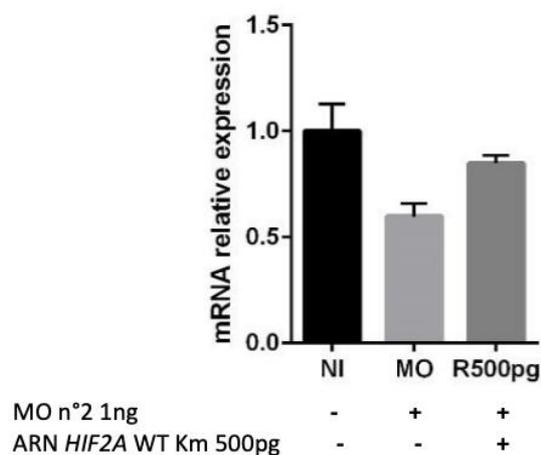


Figure 17 Résultat de RT-qPCR du gène *Hbae1* à 2dpf des poissons zèbres injectés avec morpholino n°2 à 1ng et des poissons zèbres injectés avec morpholino n°2 à 1ng avec l'ARN *HIF2a* WT Km 500pg.

II.2.2 HIF2a 2P Km Humain

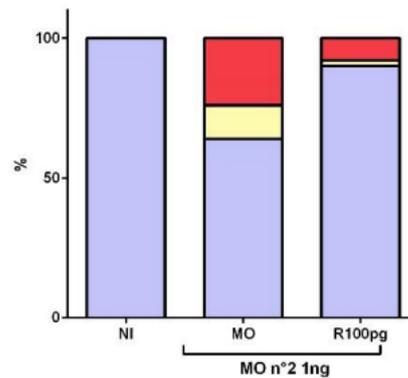


Figure 18 : Comptage de la proportion de larves pour lesquelles la circulation est altérée à 2dpf des poissons zèbres injectés avec morpholino n°2 à 1ng et des poissons zèbres injectés avec morpholino n°2 à 1ng avec l'ARN HIF2a 2P Km 100pg.

Légende : Pas de circulation (rouge), circulation de 1 cellule (orange), circulation de 2 à 10 cellules (jaune) et circulation normale (bleu)

Il semblerait que la co-injection du MO n°2 et de l'ARN *epas1a* WT du poisson zèbre entraîne un sauvetage du phénotype. De même, la co-injection du MO n°2 et du gène *HIF2a* humain semblerait entraîner un sauvetage du phénotype.

III. Knock-out *epas1a*

Pour réaliser le knock-out de notre gène *epas1a*, nous avons utilisé la technique de CRISPR-Cas9 via l'insertion au niveau de l'exon 7 d'un oligo (5' *GTCATGGCGTTTAAACCTTAATTAAGCTGTTGTAG* 3') possédant 3 codons stop (1 pour chaque cadre de lecture).

Nous avons injecté l'ARN guide, la protéine CAS9-NLS et notre oligo dans des embryons au stade 1 cellule. Pour valider par PCR l'insertion de notre oligo, nous avons désigné une paire d'amorce :

- Le primer forward (F) situé sur l'intron précédent l'exon 7 : 5' *AGAGAGTTTACATTGGCTCCCA* 3'
- Le primer reverse (R) situé sur l'oligo inséré par CRISPR-Cas9 : 5' *GGTTTAAACGCCATGAC* 3'

```

gagcagagagtttacattggctcccagcagcacaggtctgattgtttcacaagatgaaatcaacagtcataatcttggttaatgatgtcttgag
tgctctaattcaatcacgctttgtttgactgttcattagttttattcttgagccgtctttgtgtttcagAGTCAGCAGTCTGATCGGTTAC
AGACCCGAGGAACTTCTGGCCGTTCTGTCATGGCGTTTAAACCTTAATTAAGCTGTTGTAGGGTTTATGAGTTC
TGCCACGCTTTGGATTTCGGAGAACATGACAAGAGCCATCAAATCgtgagatggt
  
```

Figure 19 Séquence du gène *epas1a* au niveau de l'intron (minuscule) précédent l'exon 7 (majuscule) : séquence du gène *epas1a* visée par la CAS9 (partie jaune) et oligo inséré (partie rouge)

Si l'oligo a été correctement inséré, nous devons observer une seule amplification de 247pb.

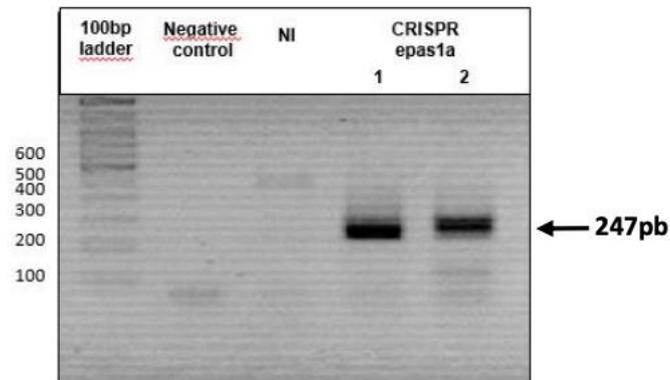


Figure 20 Résultat de PCR pour le CRISPR epas1a

Nous n'observons pas d'amplification dans les embryons WT non-injectés mais uniquement dans nos embryons WT injectés avec le CRISPR.

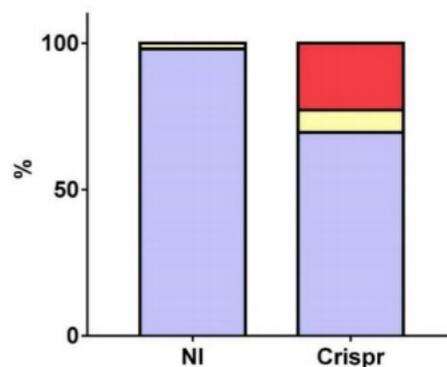


Figure 21 Comptage de la proportion de larves pour lesquelles la circulation est altérée à 3dpf des poissons zèbres injectés avec le CRISPR à 200ng.

Légende : Pas de circulation (rouge), circulation de 1 cellule (orange), circulation de 2 à 10 cellules (jaune) et circulation normale (bleu)

Nous observons une diminution du nombre de cellules circulantes chez nos embryons WT injectés avec le CRISPR.

Conclusion

Dans un premier temps, nous avons réalisé le knock-down du gène *epas1a* du poisson zèbre par l'utilisation de trois morpholinos différents.

Les résultats observés étaient les mêmes pour chacun des morpholinos avec la présence d'une anémie caractérisée par l'absence ou la diminution du nombre de cellules circulantes entraînant une diminution de l'expression des gènes de l'hémoglobine par RT-qPCR et une diminution du nombre

d'érythrocytes par cytométrie en flux. Ces résultats ont tous été validés en triplica biologique et technique. Néanmoins, une telle diminution n'a pas été observée dans le travail de Gerri et *al.*, 2018 avec le morpholino dirigé contre l'ATG.

Dans un deuxième temps, une tentative de sauvetage du phénotype observé a été réalisée par co-injection du morpholino avec les ARNm *epas1a* du poisson zèbre et *HIF2A* humain. Les premiers résultats présentés laissent supposer un sauvetage du phénotype.

Néanmoins, après deux ans de travail, nous n'avons plus retrouvé le phénotype observé suite à l'injection de nos morpholinos chez nos poissons zèbres. Les mêmes morpholinos ont été recommandés, vérifiés par GeneTools et l'ensemble des paramètres a été repris pour comprendre pourquoi du jour au lendemain nos résultats n'étaient plus reproductibles alors qu'ils l'ont été pendant plus d'2 ans et cela sans succès.

Références bibliographiques

Ang SO, Chen H, Hirota K, Gordeuk VR, Jelinek J, Guan Y, Liu E, Sergueeva AI, Miasnikova GY, Mole D, Maxwell PH, Stockton DW, Semenza GL, Prchal JT. (2002). Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia. *Nat Genet.* 32(4):614-21.

Amsterdam, A. (2006). Insertional mutagenesis in zebrafish: genes for development, genes for disease. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 5(1), 19–23.

Bento C, Percy MJ, Gardie B, Maia TM, van Wijk R, Perrotta S, Della Ragione F, Almeida H, Rossi C, Girodon F, Aström M, Neumann D, Schnittger S, Landin B, Minkov M, Randi ML, Richard S, Casadevall N, Vainchenker W, Rives S, Hermouet S, Ribeiro ML, McMullin MF, Cario H. (2014) Genetic basis of congenital erythrocytosis: mutation update and online databases. *Hum Mutat.* 35(1):15-26.

Bond J, Gale DP, Connor T et al. (2011). Dysregulation of the HIF pathway due to VHL mutation causing severe erythrocytosis and pulmonary arterial hypertension. *Blood*, 117: 3699-3701.

Carradice, D., & Lieschke, G. J. (2008). Zebrafish in hematology: Sushi or science? *Blood*, 111(7), 3331–3342.

Elks, Philip M., Stephen A. Renshaw, Annemarie H. Meijer, Sarah R. Walmsley, et Fredericus J. van Eeden. (2015) « Exploring the HIFs, Buts and Maybes of Hypoxia Signalling in Disease: Lessons from Zebrafish Models ». *Disease Models & Mechanisms* 8, no 11 : 1349-60.

Furlow PW, Percy MJ, Sutherland S et al. (2009). Erythrocytosis-associated HIF-2alpha mutations demonstrate a critical role for residues C-terminal to the hydroxylacceptor proline. *J Biol Chem*, 284: 9050-9058.

Ganis, Jared J., Nelson Hsia, Eirini Trompouki, Jill L. O. de Jong, Anthony DiBiase, Janelle S. Lambert, Zhiying Jia, et al (2012) . « Zebrafish Globin Switching Occurs in Two Developmental Stages and Is Controlled by the LCR ». *Developmental Biology* 366, no 2 : 185-94.

Gerri Claudia, Michele Marass, Andrea Rossi, et Didier Y. R. Stainier (2018). « Hif-1 α and Hif-2 α Regulate Hemogenic Endothelium and Hematopoietic Stem Cell Formation in Zebrafish ». *Blood* 131, no 9 : 963-73.

Gordeuk VR, Sergueeva AI, Miasnikova GY et al. (2004) Congenital disorder of oxygen sensing: association of the homozygous Chuvash polycythemia VHL mutation with thrombosis and vascular abnormalities but not tumors. *Blood*, 103: 3924-3932.

Gregg L. (2000). HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J. Appl. Physiol.*, 88, 1474–1480.

Hodges, V. M., Rainey, S., Lappin, T. R., & Maxwell, a. P. (2007). Pathophysiology of anemia and erythrocytosis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 64(2), 139–158.

Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503.

Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*, 30: 393-402.

Ladroue C, Hoogewijs D, Gad S et al. (2012). Distinct deregulation of the hypoxia inducible factor by PHD2 mutants identified in germline DNA of patients with polycythemia. *Haematologica*, 97: 9-14.

Lin, Tzung-Yi, Chi-Fu Chou, Hsin-Yu Chung, Chia-Yin Chiang, Chung-Hao Li, Jen-Leih Wu, Han-Jia Lin, Tun-Wen Pai, Chin-Hwa Hu, et Wen-Shyong Tzou. (2014) « Hypoxia-Inducible Factor 2 Alpha Is Essential for Hepatic Outgrowth and Functions via the Regulation of Leg1 Transcription in the Zebrafish Embryo ». *PloS One* 9, no 7 : e101980.

Link, Vinzenz, Andrej Shevchenko, et Carl-Philipp Heisenberg. (2006) « Proteomics of early zebrafish embryos ». *BMC Developmental Biology* 6, no 1 : 1.

McMullin, M. F. (2009). Idiopathic erythrocytosis: a disappearing entity. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. American Society of Hematology. Education Program, 629–35.

Percy MJ, Furlow PW, Lucas GS et al. (2008). A gain-of-function mutation in the HIF2A gene in familial erythrocytosis. *N Engl J Med*, 358: 162-168.

Percy MJ, Zhao Q, Flores A et al. (2006). A family with erythrocytosis establishes a role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 : 654-659.

Sable CA, Aliyu ZY, Dham N et al. (2012) Pulmonary artery pressure and iron deficiency in patients with upregulation of hypoxia sensing due to homozygous VHL(R200W) mutation (Chuvash polycythemia). *Haematologica*, 97: 193-200.

Van Rooijen E, Voest EE, Logister I, Korving J, Schwerte T, Schulte-Merker S, Giles RH, van Eeden FJ. (2009). Zebrafish mutants in the von Hippel-Lindau tumor suppressor display a hypoxic response and recapitulate key aspects of Chuvash polycythemia. *Blood*. 113(25):6449-60.

Wenger RH, Hoogewijs D. (2010). Regulated oxygen sensing by protein hydroxylation in renal erythropoietin-producing cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 298: F1287-1296.

Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. (2005) Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE*, 2005: re12.

Annexe 4 :

Impact of interferon on a triple positive polycythemia vera

Hugo Campario, Matthieu Mosca, Bernard Aral, Valentin Bourgeois,
Pauline Martin, Antoine Brustel, Mathilde Filser, Christophe
Marzac, Isabelle Plo, François Girodon

CAMPARIO et al., *Leukemia* 2019



Chronic Myeloproliferative Neoplasms

Impact of interferon on a triple positive polycythemia vera

Hugo Campario^{1,2} · Matthieu Mosca^{3,4,5} · Bernard Aral⁶ · Valentin Bourgeois¹ · Pauline Martin¹ · Antoine Brustel¹ · Mathilde Filser¹ · Christophe Marzac⁷ · Isabelle Plo^{3,4,5}  · François Girodon^{1,2,5}

Received: 23 August 2019 / Accepted: 28 August 2019
© Springer Nature Limited 2019

To the Editor:

Sir,

We read the paper by Julia Czech et al., “*JAK2V617F* but not *CALR* mutations confer increased molecular responses to interferon- via *JAK1/STAT1* activation” [1], with great interest. This paper reports that *JAK2V617F*-mutated patients with myeloproliferative neoplasms (MPN) have a better molecular response to pegylated interferon- α (IFN) treatment than patients with mutated *CALR*. However, the authors noted similar hematological responses in groups of patients with essential thrombocythemia (ET) or primary myelofibrosis (PMF). Here, we report on an unusual polycythemia vera (PV) patient who harbored initially only a *JAK2V617F* mutation, but secondary also a *CALR* del52 and a *MPLS505N* mutations. The *CALR* del52 clone

was resistant to IFN, which led to the absence of complete hematological (CHR) and complete molecular responses (CMR).

In patients with MPN, IFN is a very effective treatment which results in clinical, hematological, molecular, and histopathological responses [2, 3]. A hematological response is most often observed in the first year of treatment, whereas the molecular response is usually seen in the second year of therapy [4, 5].

We report here a case of IFN-resistance in a patient harboring a very unusual association of *JAK2*, *CALR*, and *MPL* mutations. Indeed, *CALR* mutations are mainly observed in ET and PMF and very rarely in PV associated with mild thrombocytosis [6]. Moreover, in most MPN cases, *JAK2* and *CALR* mutations are mutually exclusive [7, 8], despite infrequent double mutant cases corresponding to separate clones [9, 10].

A 60-year-old man initially presented with pulmonary embolism. A complete blood count revealed isolated increases in hemoglobin (230 g/L) and hematocrit (71%), and normal platelets (300 G/L), and leukocyte (10.5 G/L) counts. He was subsequently diagnosed with *JAK2V617F*-mutated PV with a 30% variant allele frequencies (VAF). Cytoreductive therapy with hydroxyurea (HU) was started and maintained for 4 years. CHR was obtained with 14 g HU/week and was associated with a decrease in the *JAK2V617F* VAF from 30 to 3% after 4 years. Due to a mild intolerance to HU and relatively young age, HU was progressively replaced by IFN that was initially administered in low doses and then increased to 135 μ g per week. At the same time, HU was gradually reduced and finally stopped. Unfortunately, 2 months after HU was discontinued, the CHR was lost and both the platelet counts and hematocrit increased. IFN was then increased to 180 μ g/week, but no CHR was obtained despite the higher doses. Moderate doses of HU (9 g/week) were therefore reintroduced for a period of 8 months. CHR and a good CMR were obtained since the *JAK2V617F* VAF in peripheral granulocytes remained stable at 3%. Another attempt was made to reduce HU, but

Isabelle Plo, François Girodon: On behalf of the French Intergroup of MPNs (FIM)

François Girodon: On behalf of MPN&MPN α -EuroNet (COST Action BM0902).[§]

✉ François Girodon
francois.girodon@chu-dijon.fr

¹ Service d'Hématologie Biologique, Pôle Biologie, CHU de Dijon, Dijon, France

² Inserm U1231, Université de Bourgogne, Dijon, France

³ Gustave Roussy, INSERM, UMR 1170, Laboratoire d'Excellence GR-Ex, Villejuif, France

⁴ Gustave Roussy, Université Paris-Sud, UMR, 1170 Villejuif, France

⁵ Laboratoire d'Excellence GR-Ex, Paris, France

⁶ Laboratoire de génétique chromosomique et moléculaire, Pôle Biologie, CHU de Dijon, Dijon, France

⁷ Laboratoire Hématologie-Immunologie, Département Biologie et Pathologie Médicales, Gustave Roussy, France

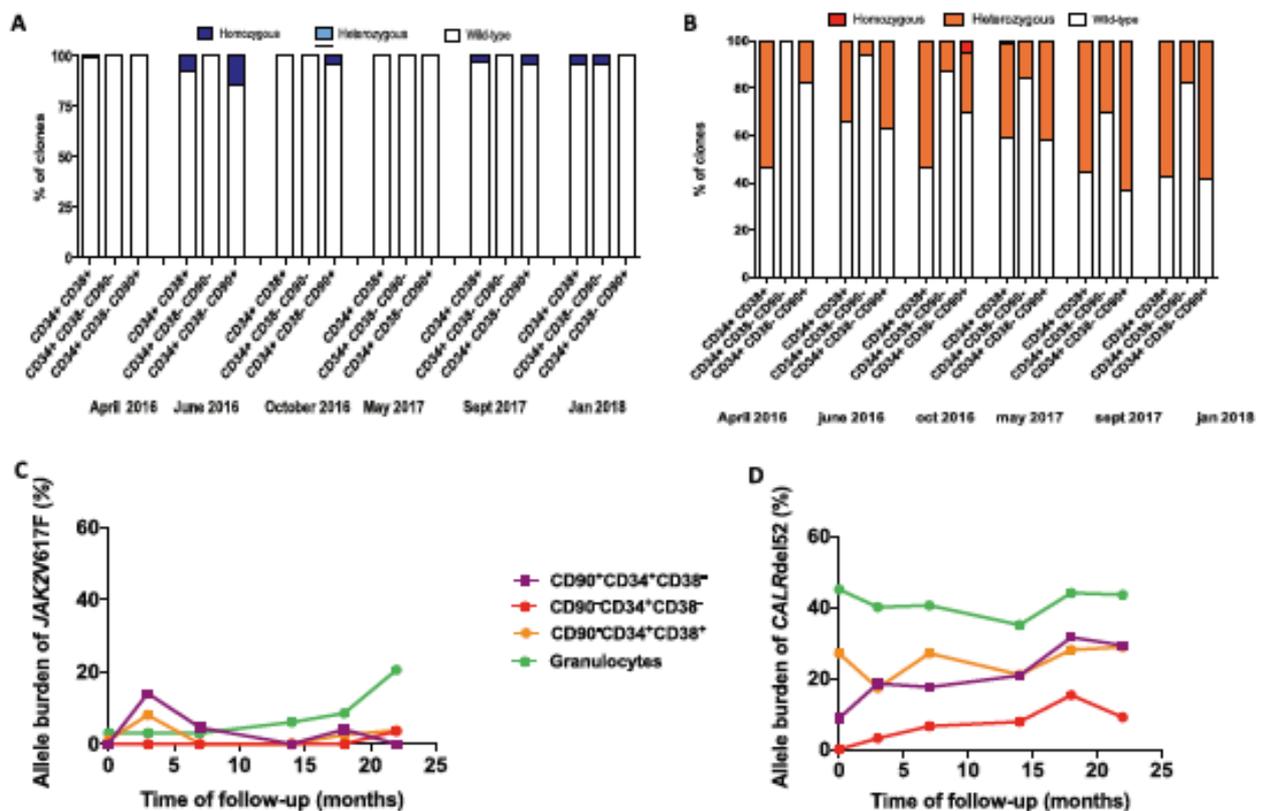


Fig. 1 The clonal architecture of hematopoiesis was obtained by genotyping the different types of progenitor colonies either HSC-enriched progenitors ($CD90^+CD34^+CD38^-$) or immature progenitors ($CD90^-CD34^+CD38^-$) or committed progenitors ($CD90^-CD34^+CD38^+$) during

follow-up. *JAK2V617F* (a) *CALR del52* (b). The variant allele frequency (VAF) was calculated in progenitors or measured in granulocytes during follow-up. *JAK2V617F* (c) *CALR del52* (d)

again resulted in the absence of CHR and a mild increase in the *JAK2V617F* VAF. Finally, after 17 months of treatment combining low doses of HU and 180 μ g/week of IFN, IFN treatment was deemed ineffective and removed from the treatment regimen. HU therapy was maintained.

In addition, next-generation sequencing analysis was performed on serial blood sample that was drawn at diagnosis, before initiating treatment with IFN and after 17 months of treatment combining low doses of HU and IFN. The results of a 77 myeloid gene-panel analysis showed at diagnosis an isolated *JAK2V617F* mutation, whereas after 4 years of HU treatment then 17 months of combine HU/IFN treatment, not only the *JAK2V617F* mutation but also a *CALR del52* mutation as well as a *MPLS505N* mutation were noted. Respectively, the VAF of *JAK2V617F*, *CALR*, and *MPL* mutations was 2%, 37%, and 38% after 4 years of HU treatment before IFN and 3%, 35%, 56% at the end of IFN treatment and at 10%, 37%, 47% 4 months after treatment arrest. At same time, hair follicle DNA analysis did not show any mutation, confirming the somatic feature of the *JAK2*, *CALR*, and *MPL* mutations. Of note, a retrospective study of the patient's

various blood counts revealed no high platelet count in the 30 years before the diagnosis of PV (the platelet count ranged from 296 to 367 G/L) ruling out an hypothetical *MPL* germline mutation.

Sequential blood samples were collected during the treatment to assess the molecular effect of IFN on *JAK2V617F* cells. Briefly, mononuclear cells and granulocytes were separated over a Ficoll density gradient. Peripheral granulocytes were obtained after lysing the red blood cells, and $CD34^+$ progenitor cells were purified with a double-positive magnetic cell sorting system (AutoMACS; Miltenyi Biotec). $CD34^+$ cells were sorted on CD90, CD34, and CD38 markers on a Becton Dickinson Influx cell sorter, and the resulting fractions of HSC-enriched progenitors ($CD90^+CD34^+CD38^-$), immature progenitors ($CD90^-CD34^+CD38^-$) and committed progenitors ($CD90^-CD34^+CD38^+$) were cloned at one progenitor/well and cultured in serum-free medium in presence of a cocktail of human recombinant cytokines. Fourteen days later, around 150 individual colonies were plucked, lysed and genotyped for the *JAK2V617F* mutation. In parallel, the *JAK2V617F* mutation was also tested in peripheral granulocytes. Sequential frozen samples

(granulocytes and progenitors) were also retrospectively genotyped for the *CALR* del52 and *MPLS505N* mutations.

We were able to observe the clonal architecture of hematopoiesis by genotyping the progenitor colonies (Fig. 1a, b). First, *JAK2V617F* and *CALR* del52 were found in two independent clones, confirming the mutually exclusive nature of the *CALR* and *JAK2* mutations. At the time of IFN treatment, the *JAK2V617F* homozygous progenitors were detected at a very low frequency (1% of committed progenitors) when compared with *CALR* del52 heterozygous progenitors (50% of committed progenitors). We observed a temporary mild increase in *JAK2V617F* progenitors followed by a complete molecular response at M15 and then a relapse at M18. In contrast, the *CALR* del52 progenitors (particularly immature and HSC-enriched) increased continuously while the patient was treated with IFN. Moreover, we have genotyped each progenitor for *MPLS505N* mutation by HRM at the beginning and end of IFN treatment. *MPLS505N* arose in a *CALR* del52 progenitors since no progenitor with *MPLS505N* alone was found. Moreover, we observed an expansion of the *CALR* del52/*MPLS505N* clone during the treatment from 70 to 86% of *CALR*-mutated progenitors.

JAK2V617F and *CALR* del52 VAF were calculated in the various progenitor types and measured in the granulocytes (Fig. 1c, d). After the switch to IFN, the *JAK2V617F* VAF in granulocytes paralleled the behavior of progenitors with a relapse after M22 (Fig. 1c). Interestingly, the *CALR* del52 VAF in granulocytes was 40% at the beginning of treatment with a lower allele burden in progenitors (0, 10, and 25%) suggesting an expansion of *CALR* del52 clone during granulocytic differentiation. Moreover, *CALR* del52 VAF in granulocytes was constant over time even though the VAF increased in progenitors indicating a clear resistance of *CALR* del52 progenitors to IFN.

This very atypical patient with complex genotypic abnormalities allowed us to clarify the impact of the treatment on mutations: our data highlight the acquisition of both *CALR* del52 and *MPLS505N* mutations under HU treatment and the inferior efficacy of IFN on *CALR* and *CALR/MPL*-mutated clones compared with *JAK2V617F*-mutated clone cells. Moreover, our results demonstrate the value of additional genomic testing (i.e., NGS) before initiating IFN treatment, and particularly in cases of MPN resistant to IFN. Finally, our results suggest that IFN should be started at early stage of MPN.

Acknowledgements This study was supported by grants from the ANR - 15-CE17-0021-03 (GenRed), the ANR-11-LABX-0051 (labex GR-Ex) and the association "Chalon sur Saône-Tulipes contre le cancer". IP was founded by MPN research foundation and INCA PLbio 2018.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

1. Czech J, Cordua S, Weinbergerova B, Baumeister J, Crepcia A, Han L, et al. *JAK2V617F* but not *CALR* mutations confer increased molecular responses to interferon- α via *JAK1/STAT1* activation. *Leukemia*. 2019;33:995–1010.
2. Kiladjian J-J, Cassinat B, Chevret S, Turlure P, Cambier N, Roussel M, et al. Pegylated interferon- α 2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. *Blood*. 2008;112:3065–72.
3. Ianotto J-C, Chauveau A, Boyer-Perrard F, Gyan E, Laribi K, Cony-Makhoul P, et al. Benefits and pitfalls of pegylated interferon- α 2a therapy in patients with myeloproliferative neoplasm-associated myelofibrosis: a French Intergroup of Myeloproliferative neoplasms (FIM) study. *Haematologica*. 2018;103:438–46.
4. Stauffer Larsen T, Iversen KF, Hansen E, Mathiasen AB, Marcher C, Frederiksen M, et al. Long term molecular responses in a cohort of Danish patients with essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis treated with recombinant interferon alpha. *Leuk Res*. 2013;37:1041–5.
5. Gisslinger H, Zagrijtschuk O, Buxhofer-Ausch V, Thaler J, Schloegl E, Gastl GA, et al. Ropeginterferon alfa-2b, a novel IFN -2b, induces high response rates with low toxicity in patients with polycythemia vera. *Blood*. 2015;126:1762–9.
6. Broséus J, Park J-H, Carillo S, Hermouet S, Girodon F. Presence of calreticulin mutations in *JAK2*-negative polycythemia vera. *Blood*. 2014;124:3964–6.
7. Usseglio F, Beauvais N, Calleja A, Raymond S, Gabert J. Detection of *CALR* and *MPL* Mutations in Low Allelic Burden *JAK2* V617F essential Thrombocythemia. *J Mol Diagn*. 2017;19:92–8.
8. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *New Engl J Med*. 2013;369:2379–90.
9. Mansier O, Paz DL, Ianotto J-C, Bris YL, Chauveau A, Boyer F, et al. Clinical and biological characterization of MPN patients harboring two driver mutations, a French intergroup of myeloproliferative neoplasms (FIM) study. *Am J Hematol*. 2018;93:E84–6.
10. Nussenzweig RH, Pham HT, Perkins SL, Prechal JT, Agarwal AM, Salama ME. Increased frequency of co-existing *JAK2* exon-12 or *MPL* exon-10 mutations in patients with low *JAK2V617F* allelic burden. *Leuk Lymphoma*. 2016;57:1429–35.

Il a été démontré que les protéines de choc thermique (HSP) jouent un rôle important dans l'érythropoïèse. Or, l'expression des gènes HSP est contrôlée par le facteur de choc thermique 1 (HSF1), un facteur de transcription hautement conservé. Jusqu'à présent, une compréhension détaillée de la fonction d'HSF1 dans l'érythropoïèse reste à établir. Dans notre étude, nous avons utilisé le poisson zèbre, modèle animal pertinent, pour étudier le rôle du gène *hsf1* pendant l'érythropoïèse embryonnaire. Nous avons établi des lignées de poisson-zèbre invalidées pour le gène *hsf1* en utilisant la technologie CRISPR/Cas9 et nous avons effectué des analyses phénotypiques tout au long de l'embryogenèse. Nous avons constaté que les embryons déficients en Hsf1 ont un nombre réduit d'érythrocytes primitifs, alors que le nombre d'érythrocytes chez les poissons zèbres adultes reste inchangé. L'expression des gènes embryonnaires des chaînes α et β -globines est réduite ainsi que l'expression de *gata1*. De plus, la morphologie des érythrocytes révèle une inhibition de la maturation des érythrocytes. En revanche, aucun changement significatif n'a été observé dans les cellules myéloïdes. Nos résultats montrent que le gène *hsf1* est un régulateur positif de la maturation des érythrocytes *in vivo*.

Mots clés : Érythropoïèse, HSF1, CRISPR/Cas9, poisson zèbre

Heat shock proteins (HSPs) are reported to play an important role in erythropoiesis. The expression of HSP genes is mainly controlled by Heat shock factor 1 (HSF1), a highly conserved transcription factor. So far, a detailed understanding of the function of HSF1 in erythropoiesis remains uncharacterized. This study has employed zebrafish as a relevant model to investigate the role of Hsf1 during embryonic erythropoiesis. We established *hsf1*-disrupted zebrafish lines using the CRISPR/Cas9 technology and performed phenotypic analyses throughout embryogenesis. We found that Hsf1 deficient embryos had a decreased number of primitive erythrocytes, while erythrocyte number in adults was unchanged. In Hsf1 deficient embryos, expression of embryonic α and β globin genes was reduced as well as *gata1* expression. In addition, the morphology of erythrocytes suggested an inhibition of erythrocyte maturation. On the other hand, no significant changes were observed in myeloid cells.

Altogether our results support a key role for Hsf1 in erythrocyte maturation *in vivo*.

Keys words: Erythropoiesis, HSF1, CRISPR/Cas9, zebrafish